

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ESTUDO DOS EFEITOS DE
METALOPROTEASES/DESINTEGRINAS ISOLADAS DO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus* SOBRE A
ADESÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA

MÁRCIA REGINA COMINETTI

SÃO CARLOS – SP

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ESTUDO DOS EFEITOS DE
METALOPROTEASES/DESINTEGRINAS ISOLADAS DO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus* SOBRE A
ADESÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA

Márcia Regina Cominetti

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

São Carlos – SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C733ee

Cominetti, Márcia Regina.

Estudo dos efeitos de metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e a expressão gênica / Márcia Regina Cominetti. -- São Carlos : UFSCar, 2004.
199 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Proteínas. 2. Células - adesão. 3. Desintegrina. 4. Integrina. I. Título.

CDD: 574.19296 (20^a)

AGRADECIMENTOS

A tarefa de agradecer às pessoas e instituições que auxiliaram na elaboração desta tese poderá eventualmente trazer consigo alguns esquecimentos não intencionais. Espero, contudo, não cometer tais esquecimentos e, se por ventura o fizer, desde já me desculpo e peço a compreensão daqueles que não estão citados nesta lista.

Em primeiro lugar, agradeço à Dra. Heloísa S. Selistre-de-Araújo, por sua orientação e dedicação. Sua competência e seriedade científica foram fundamentais para o processo que culminou com a elaboração desta tese. Ademais, no curso do trabalho, pude cultivar, além de seus sempre pertinentes ensinamentos, também sua sincera amizade.

Agradeço também ao Dr. Jay W. Fox, o qual me recebeu em seu laboratório e disponibilizou-me a estrutura necessária para que experimentos fundamentais desta tese pudessem ser realizados. À Julie Burns, sua competente secretária, agradeço pelo valioso auxílio burocrático e pessoal em todas as inúmeras vezes que necessitei durante minha estadia em Charlottesville.

Agradeço ao Dr. Paul Gallagher que pacientemente me auxiliou nos experimentos de *Microarrays*, e ao Dr. John Shannon, que me auxiliou com os experimentos de seqüenciamento da BaG, realizados no laboratório do Dr. Fox.

À Dra. Christina Barja-Fidalgo, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) agradeço pelo fornecimento dos anticorpos utilizados neste trabalho.

Ao Comitê de Venenos do Instituto Butantan (São Paulo – SP), agradeço pelo fornecimento do veneno de *B. alternatus*, indispensável à realização deste trabalho. À Dra. Ana Maria Moura-da-Silva, também do Instituto Butantan, agradeço pelo fornecimento dos *primers* para β -actina.

À Dra. Verônica Morandi e à Dra. Marta de Freitas, ambas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), agradeço pelos experimentos realizados em seus respectivos laboratórios, os quais foram fundamentais para o envio do manuscrito submetido ao JBC.

Cabe aqui um agradecimento especial ao grande colega e amigo Oscar H. P. Ramos. Sempre disposto e prestativo, seu auxílio nas atividades de laboratório e sua amizade incondicional foram de grande importância para a elaboração desta tese.

Agradeço também, de forma especial, aos demais amigos e colegas de laboratório, Ana Flávia Vitorino, Carmen L. Pontes, Caroline K. Moraes, Cristina H. B. Terruggi, Laura M. Pinotti, Lucas Tabajara, Mônica R. C. Iemma, Raquel A. Mesquita, Renner S. Leite, Roberto M. Verzola, Sabrina Peviani, e à nossa técnica, Irene do Carmo Guimarães. Nossa amizade esteve além das portas do laboratório; nossos famosos “happy hours” serão inesquecíveis e farão muita falta.

Agradeço de forma especial à Juliana U. Ribeiro, que em muito colaborou nos experimentos com a BaG. Além de ser uma prestativa “escravinha”, está se mostrando uma competente pesquisadora e tenho orgulho de poder, de alguma forma, ter contribuído para sua iniciação na carreira científica.

À Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, à Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza e à Dra. Leila Beltramini, as quais participaram de minha banca de qualificação, agradeço a colaboração e as importantes sugestões apresentadas e incorporadas a este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, agradeço pela concessão da bolsa de estudo e pela disponibilização dos recursos financeiros adicionais necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também às novas amigas que tive a grata oportunidade de estabelecer em São Carlos. Aos amigos William, Luci, Érika, Roberto, Mara, Sidney, Luciano e Cris, agradeço pelos momentos de descontração e pelo estímulo permanente.

Agradeço às minhas sempre amigas Simone, Cíntia e Edith. Embora nossos caminhos tenham naturalmente nos separado, elas estiveram sempre presentes e dispostas a dividir momentos importantes de minha vida.

Aos meus pais, Pedro e Maria Ivone, e à minha irmã Cris e meu cunhado Luciano, os quais, mesmo distantes, estiveram presentes com suas palavras de incentivo e apoio que sempre me fortaleceram.

Por fim, agradeço de forma especial ao meu marido Rodrigo, por sua extrema compreensão e paciência durante todas as etapas deste trabalho. Sua seriedade e competência profissional me servem de exemplo e inspiração. Suas palavras de carinho e incentivo nos momentos em que estive longe de sua companhia foram essenciais para que etapas difíceis deste trabalho pudessem ser cumpridas.

*Aquele que duvida e não
investiga torna-se não só infeliz,
mas também injusto.*

Blaise Pascal (1623-1662).

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM = Uma desintegrina e metaloprotease (Proteína que apresenta domínios desintegrina e metaloprotease)
BaG = *Bothrops alternatus* Gelatina (Metaloprotease/desintegrina purificada de *B. alternatus* em coluna de gelatina-Sepharose)
BSA = Albumina de soro bovina
CaCl₂ = Cloreto de cálcio
CIB = Proteína que se liga a cálcio e integrina
CMFDA = 5-cloro metil fluoresceína diacetato
DMEM = Meio modificado de Dulbecco
ECM = Matriz extracelular
EDTA = Ácido etileno diamino tetracético
EGF = Fator de crescimento epidermal
ERK = Quinase extracelular regulada
FAK = Quinase de adesão focal
FBS = Soro fetal bovino
FGF = Fator de crescimento de fibroblasto
GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
ICAM = Molécula de adesão intracelular
ICAP = Proteína associada com a região citoplasmática de integrinas
ILK = Quinase ligada a integrina
JAB = Proteína ligada ao domínio de ativação Jun
JNK = Quinase N-terminal Jun
MadCAM = Molécula de adesão celular da mucosa
MAPK = Proteína quinase ativada por mitógeno
MHD = Dose hemorrágica mínima
MIBDP = Proteína ligante da integrina β_1 específica de músculo
MTT = 3-[4,5-Dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazoleo brometo
PBS = Salina tamponada com fosfato
PDGF = Fator de crescimento derivado de plaqueta
PI-3K = Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC = Proteína quinase C
PMSF = Fenilmetilsufonilfluoreto
PVDF = Polivinilidenodifluoreto
RACK = Receptor para proteína quinase C ativada
RGD = Sequência tripeptídica (Arg-Gly-Asp)
SDS-PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SVMP = Metaloprotease de veneno de serpente
TCA = Ácido tricloroacético
TGF- β = Fator de crescimento transformante beta
VCAM = Molécula de adesão celular vascular
VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular
WAIT = Proteína associada com caudas citoplasmáticas de integrinas

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Famílias das zinco-metaloproteases</i>	6
<i>Figura 2 – Diagrama esquemático da estrutura das classes de metaloproteases de venenos de serpente</i>	9
<i>Figura 3 – Relação entre a estrutura das ADAMs e SVMPs</i>	15
<i>Figura 4 – Principais eventos de sinalização celular ocorridos após a ligação das integrinas aos seus ligantes na matriz extracelular</i>	44
<i>Figura 5 – Perfil cromatográfico das amostras do veneno bruto de <i>Bothrops alternatus</i> eluídas da coluna de Gelatina-Sepharose</i>	62
<i>Figura 6 – Perfil cromatográfico das amostras correspondentes à fração P2, eluídas da coluna de Gelatina-Sepharose e aplicadas à coluna DEAE-Sepharose</i>	64
<i>Figura 7 – Purificação da BaG</i>	66
<i>Figura 8 – Comparação da seqüência parcial de aminoácidos da BaG com outras metaloproteases de venenos de serpente</i>	68
<i>Figura 9 – Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP pela BaG-I</i>	70
<i>Figura 10 – Inibição da adesão celular pela BaG-I</i>	72
<i>Figura 11 – Determinação do IC₅₀ da atividade de inibição de adesão das células da linhagem K562 à fibronectina pela BaG-I</i>	74
<i>Figura 12 – Promoção da adesão celular pela BaG-I</i>	75
<i>Figura 13 – Especificidade de ligação da BaG-I</i>	77
<i>Figura 14 – Desadesão das células K562 pela BaG-I</i>	79
<i>Figura 15 – Inibição da proliferação de células da linhagem K562 pela BaG-I</i>	81
<i>Figura 16 – Diferenças no perfil de expressão gênica em fibroblastos humanos semeados sobre ALT-C comparado com fibroblastos semeados sobre colágeno tipo I</i>	121
<i>Figura 17 – Gráfico dos processos biológicos, gerado a partir dos genes up e down regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I</i>	122
<i>Figura 18 – Gráfico das funções moleculares, gerado a partir dos genes up e down regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I</i>	123
<i>Figura 19 – Gráfico dos componentes celulares, gerado a partir dos genes up e down regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I</i>	124
<i>Figura 20 – Diferenças no perfil de expressão de genes relacionados à sinalização e proliferação celular de fibroblastos humanos crescendo sobre ALT-C comparado com fibroblastos crescendo diretamente sobre o plástico</i>	128
<i>Figura 21 – Gráfico dos processos biológicos, gerado a partir dos genes up e down regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre o plástico</i>	129
<i>Figura 22 – Gráfico das funções moleculares, gerado a partir dos genes up e down regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre o plástico</i>	130
<i>Figura 23 – Gráfico dos componentes celulares, gerado a partir dos genes up e down regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre o plástico</i>	131
<i>Figura 24 – Indução da expressão de VEGF em fibroblastos humanos pela ALT-C</i>	134
<i>Figura 25 – Indução da expressão de VEGF em fibroblastos humanos pela ALT-C solúvel</i>	135

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Ligantes de integrinas e suas distribuições celulares</i>	35
<i>Tabela 2 – Proteínas ligantes das subunidades α e β das integrinas</i>	38
<i>Tabela 3 – Desintegrinas inibidoras da agregação plaquetária</i>	92
<i>Tabela 4 – Diferenças no perfil de expressão gênica entre fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C e fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I</i>	125
<i>Tabela 5a – Genes up regulados em fibroblastos humanos semeados sobre ALT-C comparado com fibroblastos semeados sobre plástico</i>	132
<i>Tabela 5b – Genes down regulados em fibroblastos humanos semeados sobre ALT-C comparado com fibroblastos semeados sobre plástico</i>	133

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	2
OBJETIVOS	46
MATERIAIS E MÉTODOS	47
MATERIAIS	47
Obtenção do veneno	48
MÉTODOS	48
Purificação da BaG	48
Caracterização das proteínas	50
Ensaio de atividade biológica	53
Análises estatísticas	60
RESULTADOS	62
Purificação da BaG	62
Análises da seqüência da BaG	66
Análise da atividade hemorrágica da BaG	69
Atividade de inibição da agregação plaquetária	69
Ensaio de inibição da adesão celular	71
Determinação do IC ₅₀ da adesão celular	73
Promoção da adesão	74
Desadesão celular	78
Proliferação celular	80
DISCUSSÃO	82
CAPÍTULO 2	107
MATERIAIS E MÉTODOS	109
MATERIAIS	109
MÉTODOS	109
Obtenção da Alternagina-C	109
Dosagem de proteínas	110
Manutenção das linhagens celulares	111
Tratamento das células para ensaios de <i>microarrays</i> através de <i>GeneChips</i> TM	111
Isolamento do RNA total	112
Preparação da seqüência alvo e hibridização dos <i>Gene Chips</i> TM	113
Análise dos dados	113
Ensaio de expressão de VEGF através de RT-PCR	115
Ensaio de expressão de VEGF através de ELISA	116
Análises estatísticas	117
RESULTADOS	118
Efeitos da alternagina-C (ALT-C) na expressão gênica de fibroblastos humanos	118
Efeitos da alternagina-C (ALT-C) na expressão de VEGF em fibroblastos humanos	126
DISCUSSÃO	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
ANEXOS	181

RESUMO

Esta tese apresenta o isolamento e a caracterização biológica de uma metaloprotease/desintegrina, BaG, isolada a partir do veneno bruto da serpente *Bothrops alternatus*. A BaG foi purificada através de duas etapas cromatográficas em resina de Gelatina-Sepharose 4B e DEAE-Sepharose. A massa molecular da proteína purificada foi de aproximadamente 130kDa em condições não redutoras e de 55kDa em condições redutoras. Tal comportamento migratório distinto em SDS-PAGE sugere uma estrutura dimérica para a BaG. A BaG apresentou atividade proteolítica sobre a caseína, a qual foi inibida na presença de EDTA. A BaG (10 μ g) não foi capaz de formar halos hemorrágicos após ser introduzida sub-cutaneamente em camundongos, o que sugere um caráter não hemorrágico para esta proteína. A BaG tratada com 1,10-fenantrolina (BaG-I) inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP com um IC₅₀ de 180nM e a inibiu também a adesão de células da linhagem K562, mediada por fibronectina com um IC₅₀ de 3,65 μ M. A BaG liga-se à integrina $\alpha_5\beta_1$, presente na superfície das células K562 e é capaz de promover a desadesão destas células, previamente aderidas à fibronectina, além de diminuir a viabilidade desta mesma linhagem celular após 24, 48 e 72h de incubação. Na segunda parte deste trabalho, foram realizadas análises de expressão gênica em fibroblastos humanos, após o tratamento destes com a alternagina-C (ALT-C). A ALT-C é uma proteína que apresenta os domínios desintegrina-like/rico em cisteína, isolada do veneno de *B. alternatus*. Esta proteína mostrou induzir a expressão de várias moléculas relacionadas a eventos de proliferação e sinalização celular, dentre elas o VEGF, o que foi comprovado através de ensaios de ELISA. Esta indução da expressão de VEGF poderia explicar resultados prévios obtidos com a ALT-C nos quais esta proteína é capaz de induzir a proliferação em células endoteliais.

ABSTRACT

This work presents the isolation and biological characterization of a novel metalloprotease/disintegrin, BaG, isolated from the *Bothrops alternatus* snake venom. BaG was purified in a two-step chromatographic model using Gelatin-Sepharose and DEAE-Sepharose resins. The molecular mass of purified protein was estimated by SDS-PAGE as approximately 130kDa under non-reducing conditions and 55kDa under reducing conditions. This result suggests a dimeric structure for BaG. BaG shows proteolytic activity on casein, which was inhibited by EDTA. This protein did not induce any hemorrhage when applied intradermally in mice at doses up to 10 μ g. 1,10-phenanthroline-treated BaG (BaG-I) inhibits ADP-induced platelet aggregation with an IC₅₀ of approximately 180nM. BaG-I also inhibits fibronectin-mediated cell adhesion with an IC₅₀ of 3.65 μ M. K562 cells bind to BaG-I probably through interaction with integrin $\alpha_5\beta_1$, since anti- $\alpha_5\beta_1$ antibodies inhibited K562 cell adhesion to BaG-I. BaG-I also induces the detachment of K562 cell previously bound to fibronectin and decreases the number of viable K562 cells after 24, 48 and 72h of incubation. In the second part of this work, gene expression analyses in human fibroblasts treated with alternagin-C (ALT-C) were carried out. ALT-C is a disintegrin-like/cysteine-rich protein isolated from the venom of *B. alternatus*. This protein induces the expression of various cell signaling- and cell proliferation-related genes including VEGF, which was confirmed by ELISA analysis. This induction could explain some previous results showing that ALT-C stimulates cell proliferation in endothelial cells.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Atualmente mais de duzentas espécies de serpentes venenosas já foram identificadas. Elas estão classificadas em quatro principais famílias: Hydrophiidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae (MATSUI *et al.*, 2000). O aparato produtor de veneno nas espécies destas famílias é formado por glândulas exócrinas modificadas que produzem o veneno tóxico. O ataque destas espécies de serpentes com a conseqüente inoculação de tal veneno na vítima, pode resultar em severos e perigosos sintomas.

As serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae possuem venenos altamente neurotóxicos que causam a morte devido ao bloqueio da transmissão neuromuscular. Por outro lado, venenos de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae causam choque, coagulação intravascular, hemorragia local e sistêmica, edema e necrose tecidual (NIEWIAROWSKI *et al.*, 1994). O dano tecidual local manifesta-se sobretudo através de hemorragia e necrose. Em casos de envenenamento menos severo, o efeito hemorrágico é geralmente localizado na região da picada, contudo, a hemorragia pode se espalhar para uma ampla área adjacente. Em casos mais graves pode ocorrer hemorragia em sítios mais distantes ao da picada como nos pulmões, rins, coração e até mesmo no cérebro (BJARNASON & FOX, 1994).

Devido a estes efeitos patológicos graves e muitas vezes letais, os venenos de serpente há muito tempo vêm intrigando os cientistas. Dentre os primeiros efeitos descritos para os venenos de serpente, estão aqueles obtidos por FONTANA (1781, *apud* MARSH, 1994), o qual injetou veneno viperídico na veia jugular de coelhos e imediatamente observou a sua morte e coagulação do sangue nos vasos. Muitos anos após, MITCHEL & REICHERT (1886, *apud* MARSH, 1994) estudando o veneno de cascavéis *in vitro* e *in vivo*, foram os primeiros a realizar estudos relacionados aos seus efeitos coagulantes *versus* os efeitos anticoagulantes. Os autores observaram que se o animal era morto logo após o envenenamento, o sangue mantinha sua capacidade coagulante, mas, ao contrário, se sua morte fosse mais lenta, o sangue se tornava incoagulável. Da mesma forma, em estudos *in vitro*, o fibrinogênio do sangue exposto ao veneno por longos períodos não era coagulável (MITCHEL & REICHERT, 1886, *apud* MARSH, 1994).

Todos os efeitos acima citados são gerados graças à rica e complexa mistura de componentes com diversas funções biológicas presente no veneno.

Composição dos venenos de serpente

A despeito de suas várias características tóxicas prejudiciais, os venenos de serpente têm sido amplamente investigados e há anos vêm despertando grande interesse na tentativa do isolamento de

seus componentes ativos, que podem ser utilizados como ferramentas importantes para o estudo de vários processos biológicos, tais como a adesão, migração e proliferação celular, angiogênese, agregação plaquetária, entre vários outros.

Os venenos de serpente contêm misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos. Dentre os compostos inorgânicos estão o cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco. Nem todos estes compostos são observados em todos os venenos e sua quantidade varia de acordo com a espécie em questão. A função de certos componentes inorgânicos, tais como o zinco, cobre, ferro e cobalto, está relacionada a mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos presentes no veneno, tais como as metaloproteases (BJARNASON & FOX, 1994).

No entanto, a maior parte, cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno, é de origem protéica (MARKLAND, 1998). Outros componentes incluem carboidratos (em glicoproteínas), lipídios (fosfolipídios), aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos (BJARNASON & FOX, 1994).

Existem dois tipos principais de proteases presentes nos venenos de serpente, as quais são classificadas de acordo com sua estrutura, em serino e metaloproteases (SVMPs – Snake Venom Metalloproteases). As SVMPs são membros da superfamília das proteases dependentes de zinco, também chamadas zinco-

metaloproteases. Esta superfamília é dividida de acordo com a estrutura primária de seus sítios catalíticos e inclui os grupos das zincinas, inverzincinas, carboxipeptidases e DD carboxipeptidases. O grupo das zincinas é ainda dividido em gluzincinas, aonde a terceira histidina ligante de zinco é seguida por um resíduo conservado de ácido glutâmico, e em metzincinas, aonde o terceiro ligante de zinco é uma histidina. Este último grupo é subdividido em astacinas (aonde a proteína modelo do grupo foi primeiramente descrita em crustáceos), serralisinas (encontradas em bactérias), matrixinas (metaloproteases presentes na matriz extracelular, encontradas em mamíferos) e reprolisinas (encontradas em venenos de serpentes). As SVMPs pertencem ao subgrupo das reprolisinas, caracterizado por possuir um resíduo de ácido aspártico após a terceira histidina ligante de zinco (vide figura 1) (BODE *et al.*, 1993; HOOPER, 1994).

As SVMPs têm sido associadas às atividades hemorrágica, fibrinolítica e inibidora da agregação plaquetária, decorrentes do envenenamento (BJANRNASON & FOX, 1994; HITE *et al.*, 1994; RAWLINGS & BARRETT, 1995). O evento hemorrágico se inicia com a digestão, por parte das metaloproteases, de proteínas presentes na membrana basal do endotélio dos vasos e na matriz extracelular (ECM) como laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas (BARAMOVA *et al.*, 1990). Proteínas envolvidas no mecanismo de coagulação do sangue tais como o fibrinogênio e o fator von Willebrand,

também são substratos para as metaloproteases (IMAI *et al.*, 1989; JOHNSON & OWNBY, 1993; KAMIGUTI *et al.*, 1996).

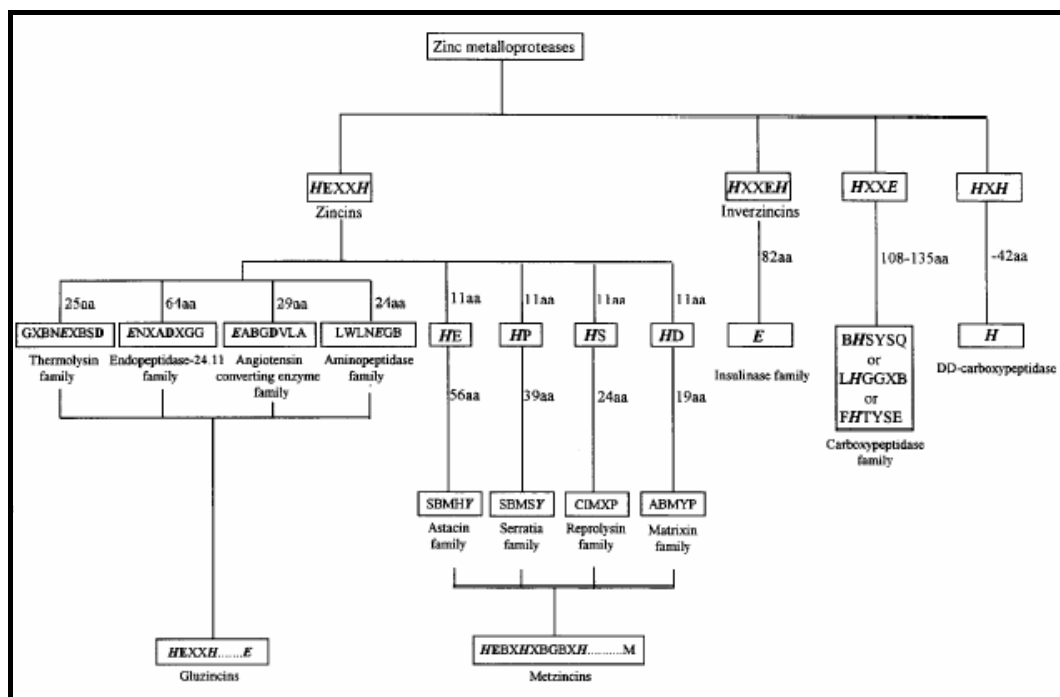


Figura 1 – Famílias das zinco-metaloproteases. Extraído de Hooper, 1994.

Contudo, metaloproteases fibrinolíticas não hemorrágicas também foram descritas em muitos venenos (WILLIS & TU, 1988; DATTA *et al.*, 1995; TERADA *et al.*, 1999). Estas enzimas possuem atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica direta, que não envolve ativação de plasminogênio. Elas clivam preferencialmente a cadeia α da fibrina e do fibrinogênio e mais lentamente a cadeia β destas proteínas (SIIGUR *et al.*, 1998).

A análise comparativa da estrutura primária das metaloproteases hemorrágicas e não hemorrágicas de venenos de

serpente evidencia um alto grau de similaridade e não fornece nenhum indício para a elucidação de características que justifiquem a especificidade por um determinado substrato ou a presença/ausência de atividade hemorrágica (TERADA *et al.*, 1999). Em vista disso, os efeitos hemorrágicos podem estar associados não somente com a estrutura protéica das SVMPs, mas podem estar também relacionados com algumas modificações pós-traducionais presentes nestas moléculas, como por exemplo, o padrão de glicosilação (HITE *et al.*, 1994). Existem várias seqüências de consenso para glicosilação nas SVMPs e algumas destas proteínas são de fato glicosiladas enquanto outras, não apresentam carboidratos associados a sua cadeia polipeptídica (BJARNASON & TU, 1978; TAKEYA *et al.*, 1990; BORKOW *et al.*, 1993; HITE *et al.*, 1994). No entanto, nenhuma correlação entre o padrão de glicosilações e atividade hemorrágica das SVMPs pode ser estabelecida até o momento.

Vários estudos relacionados à determinação do potencial hemorrágico das SVMPs já foram realizados (TAKEYA *et al.*, 1989; TAKEYA *et al.*, 1990; PAINE *et al.* 1992; MANNING, 1995; GASMI *et al.*, 2000a; TSAI *et al.* 2000). Contudo nenhum deles foi capaz de apresentar uma característica estrutural definitiva capaz de classificar uma SVMP como hemorrágica ou não hemorrágica. Mais recentemente RAMOS & SELISTRE-DE-ARAUJO (2004) apresentaram características estruturais que permitem uma diferenciação entre as SVMPs hemorrágicas e não

hemorrágicas da classe PI (vide classificação das SVMPs a seguir). Baseado na área de superfície polar, os autores concluíram que as SVMPs da classe PI não hemorrágicas possuem uma superfície maior do que as hemorrágicas, o que permitiu traçar uma linha divisória clara entre estas proteínas.

BJARNASON & FOX (1994) classificaram as metaloproteases hemorrágicas de venenos, de acordo com sua massa molecular, em pequenas (22-27kDa), médias (33-48kDa) e grandes (50-65kDa). Uma correlação entre potência da atividade hemorrágica e massa molecular foi sugerida pelos autores, uma vez que toxinas maiores, apresentam menores MHD (dose hemorrágica mínima) sendo portanto, mais potentes. As metaloproteases pequenas têm sido ainda divididas em dois subgrupos, as que possuem duas ou três pontes dissulfeto (BJARNASON & FOX, 1994; HITE *et al.*, 1994; SELISTRE-DE-ARAUJO & OWNBY, 1995; JIA *et al.*, 1996).

Estruturalmente, as metaloproteases de venenos, quando isoladas do veneno bruto, pertencem a uma das quatro classes, PI, PII, PIII ou PIV, as quais diferem entre si pela presença de domínios adicionais na região carboxil ao domínio metaloprotease (BJARNASON & FOX, 1994; HITE *et al.*, 1994) (figura 1). A classe PI possui somente o domínio metaloprotease, enquanto a classe PII possui ainda um domínio desintegrina em sua estrutura. A classe PIII possui um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina-*like* e ainda um outro domínio,

rico em cisteína. Finalmente, a classe PIV possui adicionalmente aos domínios citados, um domínio lectina em sua estrutura (BJARNASON & FOX, 1994; HITE *et al.*, 1994; JIA *et al.*, 1996) (figura 2).

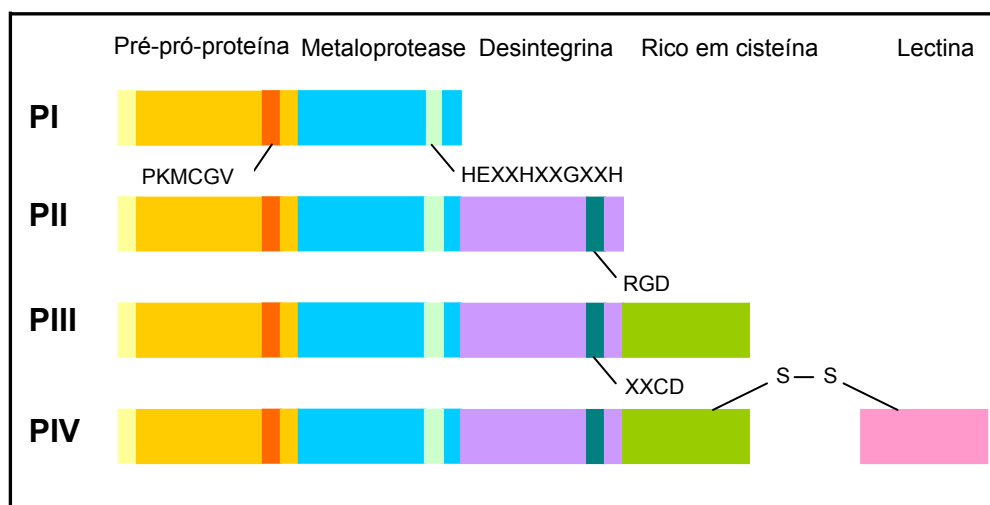


Figura 2 – Diagrama esquemático da estrutura das classes de metaloproteases de venenos de serpente. Os domínios em cada classe de proteína não estão representados proporcionalmente ao seu tamanho real. Extraído e modificado de BJARNASON & FOX, 1994.

Todas estas proteínas são sintetizadas na glândula venenífera como pré-pró-proteinases, ou seja, na forma de precursores inativos ou zimogênios estruturados. O peptídeo sinal das SVMPs possui cerca de 18 aminoácidos altamente conservados os quais servem como seqüência sinal para determinação de sua localização sub celular ou secreção (SHAH *et al.*, 1997). As SVMPs apresentam uma seqüência conservada de aminoácidos (PKMCGVT) na região C-terminal do pró-domínio, relacionada com o mecanismo de ativação por *cystein-switch*

(GRAMS *et al.*, 1993) aonde o resíduo de cisteína interage com o íon zinco presente no domínio catalítico, impedindo a entrada de água e a ligação ao substrato. A ligação do resíduo de cisteína ao zinco mantém a função da enzima inibida ou latente até sua liberação pela ação de outras metaloproteases do veneno ou ainda por auto-ativação (BJARNASON & FOX, 1994; SHIMOKAWA & TAKAHASHY, 1995).

O domínio catalítico das SVMPs contém aproximadamente 200 aminoácidos, uma seqüência consenso HEXXHXXGXXH e a presença de um motivo conhecido como *Met-turn*, caracterizado pela presença de um resíduo de metionina localizado na região C-terminal em relação ao motivo de ligação ao zinco. O zinco é coordenado por três resíduos de histidina e por uma molécula de água, em um arranjo tetraédrico (JIA *et al.*, 1996). A cadeia lateral da metionina do motivo *Met-turn* fornece uma base hidrofóbica abaixo das cadeias laterais das histidinas ligantes de zinco (BODE *et al.*, 1993).

O domínio desintegrina pode ou não conter a seqüência adesiva RGD, neste último caso a proteína é denominada desintegrina-*like*. As desintegrinas-RGD parecem ser mais facilmente processadas a partir de seus precursores, pois as formas não processadas são encontradas em menores quantidades nos venenos. YAMADA *et al.*, (1999) demonstraram que as metaloproteases da classe PII, presentes nos venenos viperídicos, também podem ser originadas de moléculas mais complexas contendo um domínio desintegrina. Neste caso, o

processamento ocorreria em nível pós-traducional e geraria as metaloproteases de cadeia curta e as desintegrinas-RGD.

Com base nas características estruturais das desintegrinas, foram descritas até o momento cinco classes diferentes destas proteínas, de acordo com o tamanho da cadeia polipeptídica e o número de pontes dissulfeto em sua estrutura: (1) as desintegrinas pequenas formadas por 49-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. Exemplos destas desintegrinas são a echistatina, eristocophina, eristostatina e ocellatusina (CALVETE *et al.*, 1992; BAUER *et al.*, 1993; McLANE *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 2002). (2) As desintegrinas de tamanho médio, compostas de aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos e seis pontes dissulfeto, derivadas das metaloproteases da classe PII. A grande maioria das desintegrinas pertence a esta classe e seus membros possuem a seqüência adesiva RGD (desintegrinas-RGD). Exemplos de desintegrinas desta classe incluem a trigramina, kistrina, flavoridina, albolabrina, entre outras (ADLER *et al.*, 1991; CALVETE *et al.*, 1992; BAUER *et al.*, 1993; KLAUS *et al.*, 1993; McLANE *et al.*, 1996). (3) As desintegrinas maiores são compostas de cerca de 84 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfeto como a bitistatina (CALVETE *et al.*, 1997) e a salmosina (PARK *et al.*, 1998). (4) As desintegrinas-like, derivadas da classe PIII das SVMPS, formadas por aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e com 16 resíduos de cisteína envolvidos na formação de oito pontes dissulfeto (KINI & EVANS, 1992; JIA *et al.*, 1996;

McLANE *et al.*, 1998; CALVETE *et al.*, 2000). (5) As desintegrinas diméricas apresentam cerca de 64 resíduos de aminoácidos, quatro pontes dissulfeto intra-cadeias e duas pontes dissulfeto inter-cadeias. As desintegrinas diméricas podem ser formadas por homodímeros como a contortostatina (TRIKHA *et al.*, 1994a), ou por heterodímeros, tais como EC3 (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999a), EMF10 (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999b), entre outras.

O domínio rico em cisteína é caracterizado pela presença de um grande número de resíduos de cisteína. Sua função ainda não está completamente elucidada, mas acredita-se que possa participar na estruturação do domínio desintegrina ou que esteja envolvido em interações com ligantes (JIA *et al.*, 1996). Recentemente, porém, domínios ricos em cisteína produzidos de forma recombinante (JIA *et al.*, 2000) e peptídeos sintéticos produzidos com base em sua estrutura (KAMIGUTI *et al.*, 2003) foram eficazes na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno.

Desintegrinas

As desintegrinas são proteínas capazes de se ligar às integrinas e interferir de inúmeras maneiras com sua função. O termo *desintegrina* foi inicialmente proposto em 1989, para descrever um grupo de peptídeos ricos em cisteína e de massa molecular entre 5 e 9kDa, os quais interagem com as integrinas presentes na superfície celular

(DENNIS *et al.*, 1989; GOULD *et al.*, 1990; NIEWIAROSWKI *et al.*, 1999). Estas moléculas foram originalmente descritas em venenos de serpente, como potentes inibidores da agregação plaquetária (GOULD *et al.*, 1990; NIEWIAROSWKI *et al.*, 1994; McLANE *et al.*, 1998). A inibição da agregação plaquetária ocorre pois a seqüência RGD das desintegrinas liga-se especificamente ao receptor de fibrinogênio, glicoproteína IIb/IIIa da membrana de plaquetas (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) o que resulta na inibição da agregação induzida por fibrinogênio (vide revisão de NIEWIAROWSKI, *et al.*, 1994).

As desintegrinas apresentam homologia com proteínas expressas em vários tecidos de mamíferos, as quais possuem funções em muitos processos fisiológicos. Estas proteínas são denominadas ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease), para designar a presença, em sua estrutura, dos domínios desintegrina e metaloprotease. As ADAMs são uma família de proteínas da superfície celular as quais combinam características de moléculas de adesão e de proteases (WOLFSBERG *et al.*, 1995).

Foram identificados até o presente momento cerca de 19 genes que codificam para ADAMs (SEEALS & COURTNEIDGE, 2003) sendo que mais de 30 membros protéicos desta família já foram descritos (STONE *et al.*, 1999; PRIMAKOFF & MYLES, 2000). As primeiras ADAMs descobertas estavam relacionadas com processos reprodutivos, particularmente a espermatogênese e a fusão entre gametas

(WOLFSBER & WHITE, 1996; MYLES & PRIMAKOFF, 1997; CHO *et al.*, 1998). De fato, estudos demonstram que a subunidade β da fertilina (ADAM-2), uma proteína presente em espermatozoides de cobaias, a primeira ADAM descrita, possui um domínio desintegrina-*like*, o qual media a fusão dos gametas, via integrina $\alpha_6\beta_1$, presente na membrana plasmática do oócito (PRIMAKOFF *et al.*, 1987; BLOBEL *et al.*, 1992; ALMEIDA *et al.*, 1995; EVANS *et al.*, 1995; CHO *et al.*, 1998; BIGLER *et al.*, 2000). Outros membros desta família de proteínas podem ter funções importantes no desenvolvimento (WOLFSBERG *et al.*, 1995). A metargidina humana (ADAM 15), a qual é o único membro descrito até o momento da família das ADAMs que possui a seqüência tripeptídica RGD no domínio desintegrina (KRATZSCHMAR *et al.*, 1996), media a adesão celular via interações com as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ (ZHANG *et al.*, 1998; NATH *et al.*, 1999).

Assim como as SVMPs, as ADAMs são estruturalmente formadas por uma seqüência sinal, um pró-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina e uma região rica em cisteína. Além destes domínios, as ADAMs também apresentam domínios EGF-*like*, transmembrana e citoplasmático (figura 3). A diferença mais importante entre as ADAMs e as SVMPs reside no fato de que as primeiras são proteínas transmembrana, enquanto que as últimas são secretadas, apesar de formas solúveis de ADAMs já terem sido descritas (KATAGIRI *et al.*, 1995; GILPIN *et al.*, 1998; KILLAR *et al.*, 1999;

LOECHEL *et al.*, 2000). Outra diferença importante entre as ADAMs e SVMPs é que estas últimas são proteases ativas, enquanto que cerca da metade das ADAMs possui alterações nas suas seqüências relacionadas ao zinco, o que resulta na ausência de atividade proteolítica (BLACK & WHITE, 1998).

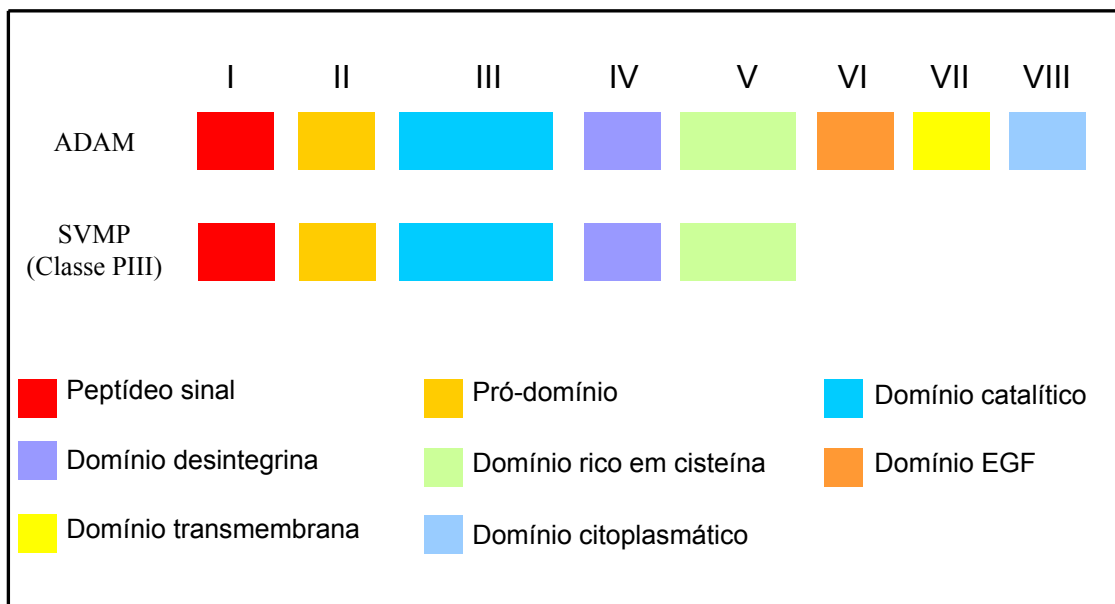


Figura 3 – Relação entre a estrutura das ADAMs e SVMPs. EGF = Fator de crescimento epidermal. Extraído e modificado de STONE *et al.*, 1999.

Várias desintegrinas monoméricas derivadas da classe PII das SVMPs são capazes de inibir a adesão de células de linhagens normais ou tumorais a seus ligantes naturais. A albolabrina inibe a adesão das mesmas células de melanoma à fibronectina, colágeno IV e laminina immobilizadas. Na concentração de 2,6 μ M esta desintegrina inibe 70% da adesão das células B16F10 à fibronectina e 60% à laminina (SOSZKA *et*

al., 1991). Em outro trabalho, a albolabrina mostrou inibir a adesão das células B16F10 à vitronectina ($IC_{50} = 0,17\mu M$), à fibronectina ($1,3\mu M$) e à laminina ($2,4\mu M$) (BEVIGLIA *et al.*, 1995). A echistatina inibe a adesão das células B16F10 à vitronectina ($IC_{50} = 0,46\mu M$), fibronectina ($2\mu M$), e laminina ($>3,7\mu M$). Neste mesmo trabalho os autores mostram que a eristostatina é a desintegrina menos eficiente na inibição da adesão das células B16F10 aos ligantes testados vitronectina ($IC_{50} = 3,5\mu M$), fibronectina ($>3,5\mu M$), e laminina ($>3,5\mu M$) (BEVIGLIA *et al.*, 1995). Em um trabalho posterior, a especificidade de ligação da eristostatina foi novamente testada. Os resultados indicam que esta desintegrina não interage com as integrinas $\alpha_5\beta_1$ ou $\alpha_v\beta_3$, mas sim com a integrina $\alpha_4\beta_1$ presente nas membranas de células das linhagens Jurkat e CHO transfectadas com a integrina α_4 , pois inibe sua ligação ao ligante VCAM-1 (DANEN *et al.*, 1998). Estes resultados explicariam os altos valores de IC_{50} encontrados na inibição das células B16F10 aos ligantes vitronectina, fibronectina e laminina pela eristostatina.

Durante os processos de invasão e formação de metástases, as células tumorais devem aderir e invadir a membrana basal penetrando no estroma intersticial. Os componentes da superfície das células tumorais desempenham funções importantes fornecendo um conjunto apropriado de receptores adesivos. Um dos eventos adesivos iniciais importantes na formação de metástases é a adesão celular ao

endotélio vascular que se retrai e expõe a membrana basal sub endotelial, a qual possui uma variedade de proteínas adesivas como fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e proteoglicanas (TARIN, 1985). A capacidade de ligação com as integrinas presentes nas células de linhagens tumorais e a conseqüente inibição da adesão destas células às proteínas presentes na membrana basal faz com que muitas desintegrinas sejam capazes de inibir a formação de metástases.

A eristostatina é capaz de inibir a metástase experimental em camundongos (DANEN *et al.*, 1998). O modelo experimental de metástase consiste na aplicação de células tumorais na veia caudal de camundongos e na análise dos órgãos alvo após um determinado período para a avaliação da formação de colônias metastáticas. A eristostatina (25µg/camundongo) foi capaz de inibir em 87% a formação de metástases pulmonares induzida pela injeção caudal de células MV3 de melanoma humano altamente invasivas. As outras desintegrinas testadas nestes experimentos, como a echistatina e a bitistatina não tiveram efeitos significativos na inibição da formação de metástases. A inibição promovida pela eristostatina poderia ocorrer devido a sua ligação com a integrina $\alpha_4\beta_1$ na membrana das células MV3, o que impediria sua ligação ao substrato VCAM-1 e conseqüentemente, a formação de colônias metastáticas (DANEN *et al.*, 1998).

Desintegrinas maiores como a salmosina também são efetivas na inibição da adesão celular e da formação de metástases. A

salmosina inibe a adesão de células de melanoma B16F10 à fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I e IV de maneira dose-dependente sendo que a eficiência da inibição é maior para colágeno IV e vitronectina (100nM) (KANG *et al.*, 2000). A salmosina foi testada no mesmo modelo de metástase descrito acima, utilizando células de melanoma B16F10. A inibição por ela produzida ocorreu de maneira dose-dependente, sendo que doses de 250 μ g/Kg camundongo foram capazes de inibir majoritariamente a formação de colônias metastáticas, porém doses de 1.250 μ g/Kg camundongo não foram capazes de inibir completamente a formação de metástases. O efeito da salmosina na supressão da metástase tumoral está relacionado com a inibição da adesão das células B16F10 à proteínas da ECM através do bloqueio das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e β_1 na superfície destas células (KANG *et al.*, 2000).

Desintegrinas-*like*

As desintegrinas-*like* podem ser derivadas das classes PIII e PIV das SVMPs e nestas proteínas, a seqüência RGD do domínio desintegrina é substituída por outras tais como a ECD. O termo desintegrina-*like* foi introduzido para diferenciar este grupo de proteínas das desintegrinas-RGD. As desintegrinas-*like* diferem das desintegrinas-RGD de várias formas. Os domínios desintegrina-*like* possuem dois resíduos cisteinil adicionais, quando comparados com as desintegrinas-RGD e portanto, o arranjo de pontes dissulfeto entre estas proteínas

parece ser diferente. Uma hipótese levantada por JIA *et al.* (1997) seria a de que uma destas cisteínas estaria envolvida em uma ligação dissulfeto entre a região amino-terminal ao domínio desintegrina-*like* (região espaçadora) e o domínio proteolítico. O segundo resíduo cisteinil poderia fazer parte de outra ligação dissulfeto com o domínio rico em cisteína. Este arranjo formaria uma estrutura contínua, interconectada por pontes dissulfeto entre a região espaçadora e os domínios desintegrina-*like* e rico em cisteína. Além disso, a presença do resíduo cisteinil adicional na seqüência ECD tornaria a topologia do domínio desintegrina-*like* nesta área bastante diferente daquela observada nas desintegrinas-RGD, sobretudo se este resíduo estiver envolvido em uma ligação dissulfeto com outro resíduo cisteinil presente em alguma outra região destas proteínas (JIA *et al.*, 1997).

Nos venenos, as desintegrinas-*like* são geralmente encontradas na forma não processada, constituindo a classe de toxinas hemorrágicas maiores com massas moleculares entre 50 e 70kDa, aproximadamente. Os principais exemplos destas desintegrinas são a jararagina (PAINE *et al.*, 1992), a atrolisina A (HITE *et al.*, 1994), a catrocolastatina (ZHOU *et al.*, 1995), a alternagina (SOUZA *et al.*, 2000) e a bothropasina (ASSAKURA *et al.*, 2003). Contudo, formas processadas menores com massas moleculares entre 23 e 32kDa aproximadamente, também são observadas. As formas processadas perdem o domínio catalítico, apresentando somente os domínios desintegrina-*like* e rico em

cisteína. Exemplos destas proteínas são a jararagina-C (USAMI *et al.*, 1994), a catrocolastatina-C (SHIMOKAWA *et al.*, 1997) e a alternagina-C (SOUZA *et al.*, 2000). Portanto, o processamento na região carboxi-terminal ao domínio metaloprotease das SVMPs da classe PII gera a liberação de desintegrinas-RGD e o processamento das SVMPs da classe PIII libera os domínios desintegrinas-*like*/rico em cisteína como uma única estrutura. Ambas as desintegrinas formadas desta maneira apresentam atividade inibitória da agregação plaquetária.

As desintegrinas-*like*, a exemplo das desintegrinas-RGD, também agem como inibidoras da agregação plaquetária (USAMI *et al.*, 1994; JIA *et al.*, 1997; SHIMOKAWA *et al.*, 1997). Além de atuar na inibição da agregação plaquetária, as desintegrinas-*like* também são capazes de se ligar às integrinas presentes na superfície de várias linhagens celulares e desta forma, inibir a adesão aos seus ligantes naturais. A alternagina-C (ALT-C) é capaz de inibir a adesão de células K562 transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ mediada pelo colágeno tipo I (SOUZA *et al.*, 2000), além de inibir a adesão de fibroblastos humanos (COMINETTI *et al.*, 2004) e células tumorais das linhagens ECV-304, HeLa e MDA-MB-231 a este mesmo ligante (resultados não publicados).

Os domínios desintegrina-*like*/rico em cisteína da jararagina inibem a adesão de células transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ e de células ECV304 e HUVEC ao colágeno tipo I (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2001). Em concentrações maiores a jararagina também inibe a adesão de

linhagens celulares que expressam as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$ aos seus respectivos ligantes naturais (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2001).

Desintegrinas diméricas

As desintegrinas podem existir nas formas monoméricas e diméricas. Mais de 30 desintegrinas monoméricas já foram descritas, todas potentes inibidoras da agregação plaquetária (GOULD *et al.*, 1990). Todas estas desintegrinas possuem em sua composição seqüências RGD – exceto a barbourina (SCARBOROUGH *et al.*, 1991) e a ussuristatina-2 (OSHIKAWA & TERADA, 1999) nas quais o motivo RGD é substituído pelo KGD e a atrolisina E, a qual possui um motivo MVD (SHIMOKAWA *et al.*, 1998) – e mantêm sua estrutura em conformações apropriadas através de pontes dissulfeto intramoleculares (NIEWIAROWSKI *et al.*, 1994; McLANE *et al.*, 1998).

Pesquisas recentes, entretanto, estão apontando a descoberta de desintegrinas diméricas, que podem ser tanto homodiméricas, com subunidades de massas moleculares e seqüências idênticas de aminoácidos; quanto heterodiméricas, com subunidades com massas moleculares e seqüências de aminoácidos distintas.

Estudos realizados por TRIKHA *et al.* (1994a) denotam a purificação da contortrostatina (CN), uma desintegrina homodimérica isolada do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix*. Em análises de espectrometria de massa esta desintegrina apresenta-se na

forma de homodímero possuindo uma massa molecular de 13,5kDa sob condições não desnaturantes e duas subunidades com massas moleculares idênticas de 6,75kDa, em condições desnaturantes. A CN apresenta atividade inibitória da agregação plaquetária, através de sua interação com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ presente na superfície das plaquetas (CLARK *et al.*, 1994).

Em outros estudos, IMAI *et al.* (1989) reportaram o isolamento da bilitoxina-1 a partir do veneno da serpente *Agkistrodon bilineatus*. Esta desintegrina pertence à classe PII das metaloproteases de venenos de serpente e possui uma estrutura homodimérica, com massa molecular de 80kDa, sob condições não redutoras e de 48kDa, sob condições de redução com β -mercaptoetanol. Além disso, a bilitoxina-1 possui um domínio desintegrina-*like* com a seqüência consenso MGD, em substituição à seqüência RGD e apresenta atividade hemorrágica, caseinolítica e fibrinogenolítica (NIKAI *et al.*, 2000).

MARCINKIEWICZ *et al.* (1999a) isolaram e caracterizaram uma nova desintegrina heterodimérica do veneno de *Echis carinatus suchoreki*. Esta desintegrina, denominada EC3, possui massa molecular de 14,7kDa e é composta de duas subunidades, EC3A e EC3B, ligadas por pontes dissulfeto. Cada subunidade contém 67 resíduos de aminoácidos, incluindo 10 cisteínas e apresenta um alto grau de homologia entre si e com algumas desintegrinas monoméricas. A EC3 inibe fortemente a adesão de células que expressam as integrinas $\alpha_4\beta_1$ e

$\alpha_4\beta_7$ a seus ligantes naturais, VCAM-1 e MadCAM, e fracamente aquelas que expressam a integrina $\alpha_5\beta_1$ e a agregação plaquetária. Na subunidade A, a seqüência RGD é substituída pela VGD e na subunidade B, pela seqüência MLD. O sítio de atividade da molécula parece residir na subunidade B, a qual contém a seqüência MLDG (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999a).

Em outro trabalho, MARCINKIEWICZ *et al.* (1999b) identificaram uma nova proteína da família das desintegrinas heterodiméricas, denominada EMF10, que foi isolada do veneno de *Eristocophis macmahoni*. Esta desintegrina é um potente inibidor da interação entre a integrina $\alpha_5\beta_1$ e seu ligante fibronectina. A EMF10 é um heterodímero contendo duas subunidades, ligadas por pontes dissulfeto. A EMF10A possui massa molecular de 7,5kDa e a EMF10B apresenta uma heterogeneidade e pode estar presente como EMF10B1 (7,0kDa) e EMF10B2 (7,4kDa).

Ambas as desintegrinas, EC3 e EMF10, possuem características bastante semelhantes e apresentam o mesmo padrão de pontes dissulfeto inter e intramoleculares. As duas proteínas são antagonistas da integrina β_1 e inibem fracamente as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$. A principal diferença entre elas é a reatividade com as integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$. Enquanto a EC3 inibe fortemente a adesão de células que expressam $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$ e mais fracamente a adesão das células que

expressam as integrinas $\alpha_5\beta_1$ aos seus respectivos ligantes, a EMF10 inibe fracamente a adesão de células que expressam a integrina $\alpha_4\beta_1$ e não interage com a integrina $\alpha_4\beta_7$. Contudo, a EMF10 inibe fortemente a adesão de células que expressam a integrina $\alpha_5\beta_1$ à fibronectina (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999b). A EC3 também inibe fortemente a adesão da integrina $\alpha_9\beta_1$ ao VCAM-1, mas não à osteopontina e à tenascina-C (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000).

Outra desintegrina dimérica presente no veneno de *E. carinatus* é a EC6. A EC6 possui efeitos muito similares aos da EC3 no que diz respeito à ligação com as integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_9\beta_1$, devido à presença de uma seqüência MLD em sua subunidade A. A EC6B possui a seqüência RGD e age como potente antagonista da ligação da integrina $\alpha_5\beta_1$ à fibronectina (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000).

Mais recentemente, duas desintegrinas diméricas homólogas foram purificadas do veneno de *Cerastes cerastes*, CC5 e CC8. Ambas as desintegrinas foram capazes de inibir a adesão de células que expressam as integrinas $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ aos seus respectivos ligantes. A desintegrina CC5 possui duas subunidades, CC5A e CC5B, as quais apresentam em sua estrutura a seqüência adesiva RGD, a desintegrina CC8 também possui duas subunidades, CC8A e CC8B, sendo que nesta última, a seqüência RGD é substituída pela WGD, o que

torna esta desintegrina mais potente com relação a sua atividade inibitória (CALVETE *et al.*, 2002).

CALVETE *et al.* (2003) purificaram e caracterizaram mais seis desintegrinas diméricas dos venenos de *Vipera lebetina obtusa* (VLO), *V. berus* (VB), *V. ammodytes* (VA), *Echis ocellatus* (EO) e *E. multisquamatus* (EMS). As desintegrinas VLO4, VB7, VA6, e EO4 apresentam em sua estrutura a seqüência adesiva RGD e inibem a adesão de células K562 à fibronectina imobilizada. As desintegrinas VLO5 e EO5 apresentam seqüências MLD e VGD, respectivamente e inibem a adesão de células expressando a integrina $\alpha_4\beta_1$ à VCAM-1. A desintegrina EMS11 interage com as integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$ com aparentemente o mesmo grau de especificidade.

Todas as desintegrinas diméricas descritas até o momento possuem 10 resíduos de cisteína em suas subunidades, as quais estão envolvidas na formação de quatro pontes dissulfeto intra-cadeias e duas pontes dissulfeto inter-cadeias. Uma exceção a esta regra é a bilitoxina-1 (NIKAI *et al.*, 2000), que possui 15 resíduos de cisteína. O mecanismo pelo qual as desintegrinas diméricas se formam no veneno ainda não está esclarecido. O trabalho de OKUDA *et al.* (2002) reporta o isolamento de uma desintegrina heterodimérica, a acostatina, a partir do veneno bruto de *Agkistrodon contortrix contortrix*. Os autores também realizaram a clonagem da acostatina e de outra desintegrina heterodimérica, a piscivostatina, previamente isolada do veneno de *Agkistrodon piscivorus*

piscivorus (OKUDA & MORITA, 2001). Neste trabalho, os autores propõem mecanismos de processamento e dimerização para as desintegrinas aonde os cDNAs de cada subunidade seriam codificados em mRNAs independentes. Nas formas precursoras a clivagem ocorreria em um resíduo de lisina de um domínio chamado pré-peptídico em ambas as cadeias α e β do futuro dímero. Esta clivagem produziria uma cadeia α madura e a cadeia precursora β , a qual estaria ainda ligada ao domínio metaloprotease e seria posteriormente digerida para liberar uma cadeia β madura. Finalmente, as cadeias α e β maduras se uniriam para a formação da proteína heterodimérica α/β através de pontes dissulfeto inter-cadeias.

As desintegrinas hétero ou homodiméricas são também capazes de interagir com uma variedade de integrinas de células normais ou tumorais e desta forma, inibir a formação de metástases em modelos experimentais. Tais desintegrinas exibem um alto grau de diversidade de seqüências em seus motivos de ligação às integrinas. Toda esta grande diversidade de estrutura e seqüência observada para as desintegrinas chama a atenção para a sua função primordial na interação com as integrinas presentes nas membranas celulares. A variedade estrutural presente nos domínios ativos de ligação das desintegrinas permite supor a existência de uma ampla gama de funções para estas moléculas.

A CN inibe a adesão de células de melanoma humano, células de câncer de mama e células de carcinoma de bexiga à vitronectina através da interação com as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ (ZHOU *et al.*, 2000a). A CN inibe também a adesão de células de melanoma humano M24 ao colágeno tipo I, vitronectina e fibronectina (TRIKHA *et al.*, 1994b) e células de câncer de cólon à vitronectina (MARKLAND & ZHOU, 1999). A CN foi ainda testada em ensaios de invasão com células de câncer de ovário humano (OVCAR-5) em câmaras de Boyden modificadas aonde uma diluição de matrigel era immobilizada nos poços inferiores e células tratadas ou não com CN eram aplicadas nos poços superiores. A migração das células para o matrigel era analisada após o período de incubação. O matrigel corresponde a uma substância com propriedades estruturais e moleculares similares as da membrana basal, podendo conter, dependendo da origem, várias proteínas da ECM como laminina, colágeno tipo IV e proteoglicanas. A CN (1 μ M) inibiu completamente a invasão das células OVCAR-5 através do matrigel, e tal inibição foi mediada pela integrina $\alpha_v\beta_5$, uma vez que a incubação com anticorpos anti- $\alpha_v\beta_5$ inibiu completamente a adesão de células T24 à vitronectina (ZHOU *et al.*, 2000a; MARKLAND *et al.*, 2001). Em um modelo de metástase experimental *in vivo*, doses de 20 e 100 μ g de CN inibiram a colonização das células M24 nos pulmões dos camundongos testados em 51 e 73%, respectivamente (TRIKHA *et al.*, 1994b). Além

disso, a CN ainda inibiu a invasão de células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-435 através do matrigel. A injeção local diária de CN (5µg/camundongo/dia) nas massas tumorais de camundongos inibiu o crescimento do tumor em 74% e reduziu o número de macro metástases pulmonares em 68% e de micro metástases em 62,4%. A CN não foi tóxica para as células e não inibiu sua proliferação *in vitro*, mas inibiu a angiogênese tumoral. A ligação da CN com a integrina $\alpha_v\beta_3$ na superfície das células tumorais foi responsável pelo efeito da inibição da progressão tumoral *in vivo* (ZHOU *et al.*, 2000b).

O processo de invasão e metástase é uma complexa cascata de eventos adesivos, sendo que as células tumorais apresentam alterações tanto nos processos de adesão célula-célula, quanto na adesão célula-substrato. Os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos em tais processos ainda não estão elucidados em sua totalidade. Contudo, o estudo dos receptores celulares que mediam os eventos adesivos é importante na busca de terapias que possam inibir a disseminação tumoral (RUOSLAHTI & GIANCOTTI, 1989). A formação de novos vasos sanguíneos no interior do tumor é indispensável para o seu crescimento e para a disseminação das células tumorais para a corrente sanguínea. A integrina $\alpha_v\beta_3$ participa ativamente na angiogênese e no crescimento do tumor. A expressão desta molécula aumenta em células vasculares como resposta a fatores de crescimento ou a fatores angiogênicos tumorais (van WAES, 1995). Utilizando bloqueadores da

integrina $\alpha_v\beta_3$ (anticorpos ou peptídeos cíclicos), observou-se uma diminuição importante na neovascularização do tumor, em camundongos. Estes antagonistas induzem a apoptose das células angiogênicas vasculares proliferativas (BROOKS *et al.*, 1994; BROOKS *et al.*, 1995). Desta forma, estes antagonistas de integrinas têm sido sugeridos como candidatos para uso terapêutico no tratamento de doenças como o câncer principalmente.

As interações entre células neoplásicas e plaquetas contribuem para a disseminação do câncer, via circulação sangüínea. A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que é expressa tanto na superfície das plaquetas, como em algumas células tumorais, favorece a união heterotípica entre ambas. A adesão de células tumorais à ECM é estimulada pela presença de plaquetas e o bloqueio da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ provoca a perda da capacidade aderente entre as mesmas (DARDIK *et al.*, 1997). O emprego de bloqueadores da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (anticorpos ou ligantes solúveis) inibe a adesão entre células tumorais e plaquetas. Há muitos anos, sabe-se que a administração de peptídeos sintéticos solúveis que contêm a seqüência RGD, inibe a formação de metástases (HUMPRIES *et al.*, 1986). Compostos não peptídicos, contendo a seqüência RGD, foram desenvolvidos e também são capazes de inibir a formação de metástases (HARDAN *et al.*, 1993). Contudo, o efeito na inibição da formação de metástases promovido por desintegrinas contendo a seqüência RGD é

sempre muitas vezes mais potente que o efeito dos peptídeos RGD sintéticos. Isto provavelmente se deve a complexidade estrutural destas proteínas, visto que resíduos adjacentes à seqüência adesiva RGD (ou outra) e a própria estrutura tridimensional das desintegrinas têm se mostrado importante para a ligação aos seus ligantes específicos. Além disso, a estrutura da região C-terminal e o padrão de pontes dissulfeto das desintegrinas também parecem interferir com a especificidade destas proteínas. Assim, o estudo das características estruturais bem como de especificidade das desintegrinas torna-se extremamente importante na busca de ferramentas para a terapia de várias doenças.

As desintegrinas presentes nos venenos de serpente, portanto, são potenciais candidatas para o uso como anti-metastáticos, além de importantes ferramentas para estudos de adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular. Uma vez que as desintegrinas são capazes de interferir na adesão através da ligação específica com integrinas da superfície celular, compostos menores e menos imunogênicos baseados em sua estrutura podem ser desenvolvidos e utilizados como medicamentos.

Integrinas

As células do corpo de qualquer organismo pluricelular mantêm-se unidas entre si e com o material adjacente, ou seja, com a ECM. Esta adesão mantém os tecidos unidos e, portanto, é essencial à

sobrevivência. Além disso, a ancoragem ao substrato, para células que crescem aderidas, é de fundamental importância para sua sobrevivência e proliferação. Se tal ancoragem é prejudicada ou perdida, as células entram em um processo de morte celular programada, ou apoptose. As células provenientes de tumores são capazes de burlar este mecanismo apoptótico e desta forma podem disseminar o foco tumoral para outras partes do corpo, efeito característico da formação de metástases. As interações entre células ou entre células e a ECM são fatores chave em processos de adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular. Tais interações são mediadas por moléculas específicas, localizadas nas membranas celulares. Várias classes de moléculas de adesão da superfície celular já foram identificadas e caracterizadas. Dentre os principais representantes destas classes de moléculas estão (1) as integrinas, (2) as caderinas, (3) os membros da super família das imunoglobulinas, (4) as selectinas, (5) as proteoglicanas da superfície celular e (6) as ADAMs.

As integrinas formam uma classe de moléculas de adesão localizadas na superfície celular, que mediam as interações célula-célula e célula-ECM (HYNES, 1992; PETRUZZELLI *et al.*, 1999). Estas interações são cruciais para diversos processos biológicos, tais como diferenciação, migração e proliferação celular, desenvolvimento embrionário, transdução de sinais, resposta imunológica, manutenção da

estrutura celular, cicatrização de ferimentos e metástase tumoral (WAGNER & WYSS, 1994).

O termo *integrina* foi inicialmente proposto para enfatizar a função destes receptores na integração do citoesqueleto celular com a ECM (HYNES, 1987). Estruturalmente, as integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas, formadas por uma subunidade α (120 a 180kDa) e uma subunidade β (90 a 110kDa), ligadas não covalentemente entre si. As subunidades α possuem em seus domínios citoplasmáticos seqüências altamente conservadas (GFFKR), o que poderia estar relacionado a mecanismos de transdução de sinais ou à interação de suas subunidades α e β (WAGNER & WYSS, 1994). A associação dos diferentes tipos de subunidades α e β pode formar proteínas com diferentes especificidades de ligação e, conseqüentemente, com diferentes atividades biológicas (PLOW *et al.*, 2000).

Originalmente foram descritas três subunidades β (β_1 , β_2 e β_3), porém, atualmente este número expandiu-se para oito, enquanto que o número de subunidades α , chega a dezoito (HUMPRIES *et al.*, 2003). A grande maioria das integrinas, porém não a sua totalidade, reconhece seqüências Arg-Gly-Asp (RGD) presentes em alguns componentes da matriz, tais como a fibronectina, a vitronectina e o fibrinogênio (YAMADA, 1991). Algumas integrinas reconhecem seletivamente uma única proteína da ECM, enquanto outras podem se ligar a dois ou mais ligantes. Da

mesma forma, as proteínas da ECM podem se ligar a várias integrinas (HYNES, 1987; ALBELDA, 1990). A grande maioria das interações mediadas por integrinas é heterotípica, como por exemplo, a ligação da integrina $\alpha_5\beta_1$ à fibronectina. Entretanto, podem ocorrer também interações heterofílicas entre integrinas, como a ligação entre as integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$ (SYMINGTON *et al.*, 1993) e interações homofílicas aonde a integrina $\alpha_3\beta_1$ faz ligações entre si para mediar a adesão intercelular (SRIRAMARAO *et al.*, 1993).

Baseado em sua subunidade β , as integrinas foram classificadas em vários subgrupos (vide tabela 1). De acordo com esta organização, os subgrupos apresentam certas características fisiológicas semelhantes. As integrinas β_1 , por exemplo, contribuem para a organização dos tecidos através da ligação de moléculas da ECM com a membrana basal do tecido muscular, epitelial, nervoso e endotelial (HYNES, 1992), através de sua ligação a macromoléculas do tecido conectivo, tais como a fibronectina, o colágeno e a laminina (GREEN *et al.*, 1998). As integrinas β_2 , por sua vez, são expressas exclusivamente nos leucócitos e mediam o recrutamento dos mesmos aos sítios de inflamação (SPRINGER, 1990; 1994). As integrinas β_3 estão envolvidas na adesão de ligantes “vasculares” tais como a fibronectina, o fibrinogênio, a vitronectina, a trombospondina e o fator von Willebrand (GREEN *et al.* 1998; COPPOLINO & DEDHAR, 2000) e foram

identificadas em plaquetas e em células da linhagem dos megacarioblastóides (PHILLIPS *et al.*, 1991). A integrina melhor estudada é a $\alpha_{IIb}\beta_3$, presente na estrutura das plaquetas. Esta integrina reconhece a seqüência RGD presente no fibrinogênio e media a agregação plaquetária (WAGNER & WYSS, 1994). A integrina $\alpha_v\beta_3$ é expressa principalmente nas células endoteliais e possui uma importante função na angiogênese normal e tumoral. A integrina $\alpha_5\beta_1$ está amplamente distribuída em uma variedade de células e possui uma função crítica na adesão celular à ECM, bem como na formação de tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário (HYNES, 1996). Os principais ligantes das integrinas pertencem a duas categorias: (1) moléculas da superfície celular, tais como moléculas de adesão intracelular, ICAMs (*Intracellular cell adhesion molecule*), moléculas de adesão celular vasculares, VCAMs (*Vascular cell adhesion molecule*) ou moléculas de adesão celular das mucosas, MAdCAMs (*Mucosal addressin cell adhesion molecule*) e (2) uma variedade de proteínas presentes na ECM, tais como a fibronectina, a vitronectina, o fibrinogênio, o componente iC3b do sistema complemento, entre outros (tabela 1) (SPRINGER, 1990; 1994).

Tabela 1 – Ligantes de integrinas e suas distribuições celulares*

SUBUNIDADE		LIGANTES	DISTRIBUIÇÃO CELULAR		
			Não-leucócito	Leucócito	
β_1	α_1	CO, laminina	F, MB	atB, atT	
	α_2	CO, laminina	P, F, EN, EP	ActT	
	α_3	CO, laminina, fibronectina, trombospondina	EP, F		
	α_4	Fibronectina, VCAM-1	NC, F	B, T, M, LGG	
	α_5	Fibronectina	F, EP, EN, P	Th, T	
	α_6	Laminina	P	T	
	α_7	Laminina	MIO, EP		
	α_8	OP, vitronectina, fibronectina, tenascina	EP, CN		
	α_9	Tenascina, osteopontina, VCAM-1	MIO, EP	NEU	
	α_{10}	CO	CON		
	α_{11}	CO	MES		
	α_V	OP, vitronectina, fibronectina	F		
	β_2	α_L	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3		B, T, M, G
		α_M	iC3b, fibrinogênio, fator X, ICAM-1		M, G
α_X		iC3b, fibrinogênio		M, G	
α_D		VCAM-1, ICAMs			
β_3	α_{IIb}	Fibrinogênio, fibronectina, vWF, vitronectina, trombospondina, CO	P		
	α_V	Fibronectina, Fibrinogênio, vWF, Trombospondina, Vitronectina, CO, OP	EM		
β_4	α_6	Laminina	C		
β_5	α_V	Fibronectina, vitronectina	C, F, EP, AST		
β_6	α_V	Fibronectina, Tenascina	C, EP		
β_7	α_4	Fibronectina, VCAM, MadCAM		LIE	
	α_E	Caderina E		LIE	
β_8	α_V	Fibronectina, VCAM-1, laminina, CO	AST		

*Baseado em CAMPER *et al.*, 1998; MILNER *et al.*, 1999; PETRUZZELLI *et al.*, 1999, TAOOKA *et al.*, 1999. AST = astrócitos; atB = células B ativadas; atT = células T ativadas, B = células B; C = células de carcinoma; CON = condrócitos; CN = células derivadas da crista neural; CO = colágenos; EN = endotélio; EP = epitélio; F = fibroblastos; G = granulócitos, LIE = linfócitos intraepiteliais; LGG = linfócitos granulares grandes; M = monócitos; MB = membranas basais, MES = células mesenquimais; MIO = miócitos; NEU = neutrófilos; OP = osteopontina; P = plaquetas; T = células T; Th = timócitos, vWF = Fator von Willebrand.

Integrinas e sinalização celular

A integração promovida pelas integrinas entre o citoesqueleto celular e a ECM gera a produção de força mecânica sobre a membrana plasmática. Isto permite às células gerar tração durante sua migração, e tensão durante o remodelamento da ECM (CHOQUET *et al.*, 1997). A cauda citoplasmática das integrinas é geralmente curta e não apresenta características enzimáticas. Ainda assim, as integrinas são capazes de transduzir sinais, sobretudo devido a presença de proteínas acessórias adaptadoras que as conectam ao citoesqueleto, às quinases citoplasmáticas e aos receptores transmembrana de fatores de crescimento (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; LIU *et al.*, 2000).

A cauda citoplasmática da subunidade β das integrinas parece funcionar como principal região de ligação de proteínas acessórias, contudo, outras regiões presentes nas subunidades das integrinas também podem servir como sítios de ligação para proteínas.

Várias proteínas com diferentes funções já foram identificadas como ligantes do domínio citoplasmático das subunidades α e β das integrinas, sendo que as principais já identificadas estão sumarizadas na tabela 2. Estas moléculas acessórias podem ser ativadas sob a ação de estímulos específicos, os quais podem variar de acordo com o tipo celular e com o próprio estímulo recebido pela célula (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; COPPOLINO & DEDHAR, 2000; LIU *et al.*, 2000).

Quando as integrinas se ligam às proteínas da ECM, as mesmas se agrupam na base da membrana celular (processo chamado *clustering* de integrinas) e se associam a um complexo sinalizador que promove a organização dos filamentos de actina em fibras maiores, o que por sua vez promove um maior agrupamento de integrinas, reforçando assim sua ligação à ECM, em um sistema de *feedback* positivo (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999). Como resultado, as proteínas da ECM, as integrinas e as proteínas do citoesqueleto se organizam em agregados em cada lado da membrana, que são denominados adesões focais (LO & CHEN, 1994; BURRIDGE & CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996). As adesões focais são portanto, sítios formados por complexos de várias moléculas extremamente dinâmicas que promovem a ligação entre as integrinas e o citoesqueleto intracelular, iniciando processos de sinalização celular (HUANG & INGBER, 1999; HOWE *et al.*, 1998; GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; SCHWARTZ & BARON, 1999; SCHWARTZ, 2001; HUMPRIES *et al.*, 2003).

As moléculas presentes nas adesões focais podem apresentar tanto funções estruturais quanto funções sinalizadoras. Exemplos de proteínas localizadas nestes sítios são: α -actinina, vinculina, talina, tensina, paxilina, proteínas quinase, quinase de adesão focal (FAK – *Focal adhesion kinase*) e proteína quinase C (PKC – *Protein kinase C*).

Tabela 2 – Proteínas ligantes das subunidades α e β das integrinas*

Proteína ligante	Subunidade da integrina
<i>Proteínas que se ligam a actina</i>	
Talina	$\beta_1, \beta_2, \beta_3$
Filamina	$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_7$
α -actinina	β_1, β_2
F-actina	α_2
Miosina	β_3
Skelemina	β_1, β_3
<i>Proteínas sinalizadoras</i>	
ILK	β_1, β_3
FAK	$\beta_1, \beta_2, \beta_3$
Citoesina-1	β_2
Citoesina-3	β_2
<i>Outras proteínas</i>	
Paxilina	$\beta_1, \beta_3, \beta_4$
Grb2	β_3
Shc	β_3
β_3 -endoxina	β_3
TAP-20	β_5
CIB	α_{IIb}
Calreticulina	α
Caveolina	α
Rack1	$\beta_1, \beta_2, \beta_5$
WAIT-1	β_7
JAB1	β_2
Melusina	β_1
MIBP	β_1
ICAP-1	β_1
CD98	β_1, β_3
DRAL/FHL2	β

*Extraído e modificado de LIU *et al.*, 2000, ILK = *Integrin linked kinase*, FAK = *Focal adhesion kinase*, CIB = *Calcium- and integrin-binding protein*, Rack = *Receptor for activated protein kinase-C*, WAIT = *WD Protein associated with integrin tails*, JAB = *Jun-activation-domain-binding protein*, MIBDP = *Muscle-specific β_1 -integrin-binding protein*, ICAP = *Integrin cytoplasmic associated protein*.

Devido à sua rica composição, as adesões focais são consideradas por alguns autores como organelas de transdução de sinais (LO & CHEN, 1994).

Nos sítios de adesão focal, a conexão entre citoesqueleto e as integrinas promove a ativação destas últimas, que apresentam mudanças em sua conformação e um aumento em sua especificidade de ligação. Esta habilidade das integrinas em controlar sua afinidade por ligantes é crucial para a adesão celular e é conhecida como sinalização *inside-out* (HYNES, 1992; SCHWARTZ, 1995; HYNES, 1999; COPPOLINO & DEDHAR, 2000). Contudo, as integrinas podem transmitir sinais através de ambas as direções da membrana celular. Portanto, a atividade de ligação extracelular das integrinas é regulada internamente na célula (sinalização *inside-out*), enquanto que a ligação de proteínas da ECM às integrinas promove sinais que são transmitidos para o interior da célula (sinalização *outside-in*) (WILLIAMS *et al.*, 1994).

Depois de ativadas, as integrinas podem apresentar um vasto repertório de mecanismos de transdução de sinais, tais como ativação de GTPases que levam a mudanças na organização do citoesqueleto, ativação de vias de sinalização da MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) e ativação de uma variedade de proteínas quinase. A ativação das integrinas pode ainda resultar na liberação de lipídeos como segundo mensageiros e alterar os níveis intracelulares de cálcio e os valores de pH (LAFLAME & AUER, 1996).

Um evento inicial durante a sinalização via integrina é a fosforilação da FAK (*Focal adhesion kinase*) (LAFLAME & AUER, 1996), um processo ainda não completamente elucidado. A FAK, como o próprio

nome diz, é uma tirosina quinase localizada exclusivamente nos sítios de adesão focal e é ativada após a adesão mediada por integrinas. A FAK pode ser recrutada para os sítios de adesão focal por que é capaz de interagir diretamente – ou através de proteínas do citoesqueleto como talina e paxilina – com a cauda citoplasmática das subunidades β das integrinas (CHEN *et al.*, 1995; LEWIS & SCHWATRZ, 1995). Após sua ativação, a FAK auto-fosforila um resíduo de tirosina em sua estrutura, criando um novo sítio de ligação para outras proteínas, que por sua vez fosforilam ainda outras proteínas presentes nas adesões focais. A FAK também se combina e muitas vezes ativa a PI-3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*). Todas estas interações ligam a FAK a vias de sinalização que modificam o citoesqueleto e ativam as cascatas da MAPK (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999).

A MAPK compõe uma família de proteínas quinase que fosforilam resíduos específicos de serina e treonina nas proteínas alvo (substratos) e assim regulam atividades de expressão gênica, mitose, migração, proliferação e morte celular. Sua localização em pontos de convergência de múltiplas vias de sinalização permite que estas proteínas participem na regulação de tais processos celulares (LIN *et al.*, 1997; MIYAMOTO *et al.*, 1996; APLIN & JULIANO, 1999; JOHNSON & LAPADAT, 2002). Os substratos destas enzimas incluem desde outras proteínas quinase até fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. Assim como seus substratos, as MAPKs também são

reguladas por fosforilação e proteínas fosfatases são capazes de reverter tais fosforilações, tanto de sua própria estrutura, quanto da estrutura de seus substratos. Existem três subfamílias da MAPKs caracterizadas em organismos superiores: (1) a subfamília das ERKs (*Extracellular regulated kinases*) (ERK1 e 2), (2) a subfamília das JNKs (*Jun N-terminal kinases*) (JNK1, 2 e 3) e (3) a subfamília das p38 quinases (α , β , γ e δ) (JOHNSON & LAPADAT, 2002).

As ERKs são amplamente expressas e estão envolvidas em uma variedade de processos como divisão e diferenciação celular. A via de sinalização da ERK pode ser ativada por vários estímulos como fatores de crescimento, citocinas, infecção viral, agentes transformantes e carcinogênicos. As JNKs por sua vez, são ativadas em resposta a alguns estímulos como radiação ultravioleta, fatores de crescimento e mudanças na osmolaridade celular. Após a ativação da via, a JNK pode ser translocada para o núcleo da célula e deste modo ativar fatores de transcrição, regulando a proliferação ou a morte celular. A subfamília das p38 quinases regula a expressão de muitas citocinas e tem função importante na ativação da resposta imune. Os componentes desta subfamília são ativados pela ação hormonal, por ligantes da proteína G e por situações de choque por calor e osmótico (JOHNSON & LAPADAT, 2002). Deste modo, a ativação da FAK mediada por integrinas e a conseqüente ativação das vias da MAPK, produz sinais fundamentais

para a progressão do ciclo celular, migração, morte ou proliferação celular.

As integrinas, contudo não produzem somente sinais individuais, mas também são necessárias para a ótima ativação de receptores de fatores de crescimento, tais como os receptores para insulina, PDGF (*Platelet-derived growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*) e VEGF (*Vascular endothelial growth factor*).

O VEGF pertence a uma família de glicoproteínas homodiméricas e é sobretudo um potente fator de crescimento vascular relacionado com virtualmente todas as desordens angiogênicas conhecidas, incluindo câncer, isquemia e inflamação (FERRARA & HENZEL, 1989; FERRARA *et al.*, 1992; CARMELIET, 2003; CROSS *et al.*, 2003). Além disso, o VEGF exerce outras funções nas células endoteliais como indução da permeabilidade vascular (SENGER *et al.*, 1983, 1990), sobrevivência celular (ALON *et al.*, 1995; PIERCE *et al.*, 1996; GERBER *et al.*, 1998), estimulação da adesão e migração (BYZOVA *et al.*, 2000) e indução da expressão gênica (SENGER, 2001). O VEGF, porém não é somente expresso em células endoteliais, mas sim em uma variedade de células em resposta a mediadores solúveis como o EGF e o TGF- β 1 (*Transforming growth factor- β 1*), e fatores ambientais de *stress* como a hipóxia (HARRIS, 2002).

Desta maneira, a formação do *clustering* de integrinas e sua associação com o citoesqueleto celular, parece dar origem a complexos

formados por integrinas e receptores de fatores de crescimento (MIYAMOTO *et al.*, 1996) que se agregam tornando-se parcialmente ativados (MORO *et al.*, 1998). Em contrapartida, fatores de crescimento como o VEGF, são capazes de ativar integrinas aumentando a capacidade de ligação das células a seus ligantes, bem como a migração celular (BYZOVA *et al.*, 2000). A figura 3 apresenta os principais eventos de transdução de sinais ocorridos após a ligação das integrinas aos seus ligantes naturais presentes na ECM.

Com base em todos os aspectos citados acima fica evidente que as integrinas não representam apenas um grupo de moléculas estruturais da superfície celular, mas além disso, proteínas capazes de transmitir sinais, em ambas as direções através da membrana celular, que são fundamentais em vários processos fisiológicos normais ou patológicos. O estudo de proteínas capazes de se ligar e interferir com suas funções, como as desintegrinas presentes nos venenos de serpente, torna-se cada vez mais importante pois muitas destas proteínas possuem características únicas que as tornam moléculas chave para a compreensão de vários fenômenos biológicos mediados por integrinas.

Assim, o isolamento, a caracterização e a determinação da estrutura de novas desintegrinas presentes nos venenos de serpente oferecem valiosas ferramentas para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos para um vasto número de doenças.

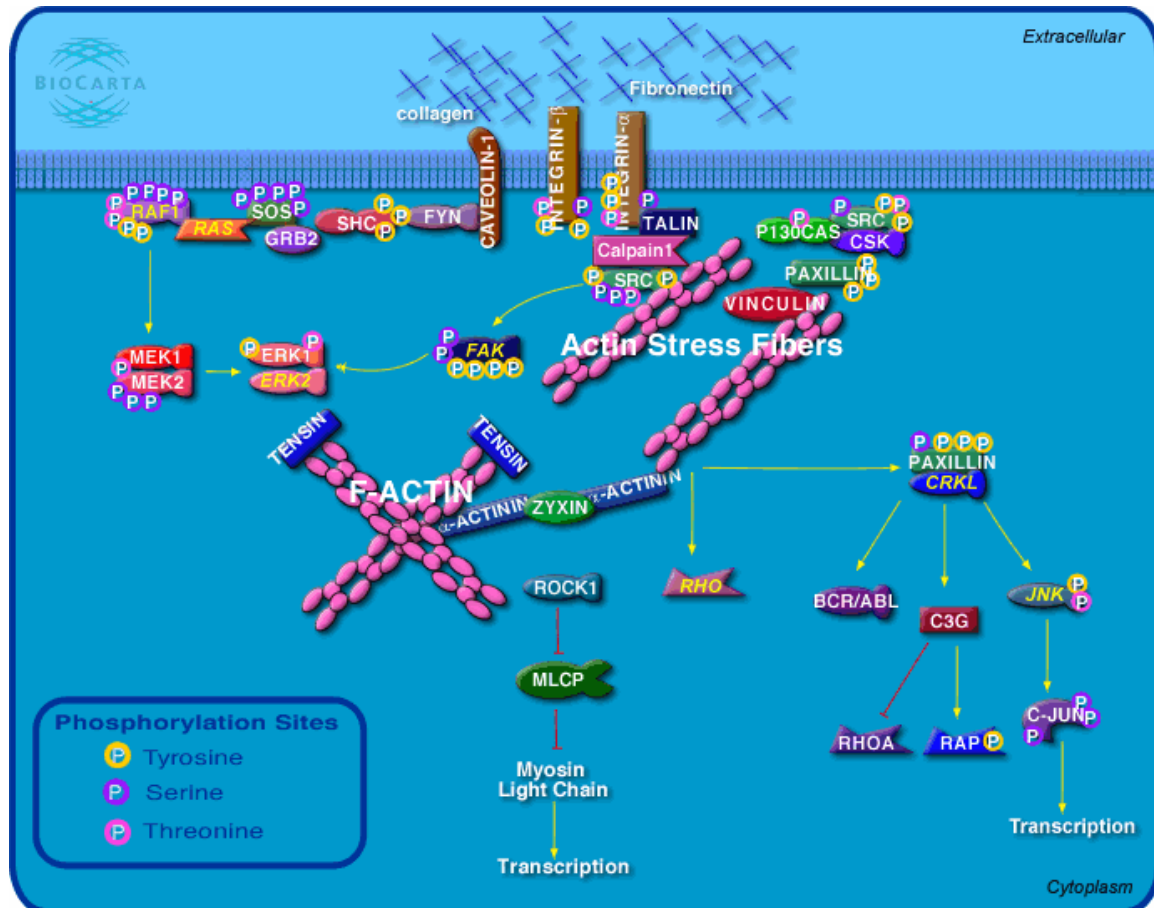


Figura 4 – Principais eventos de sinalização celular ocorridos após a ligação das integrinas aos seus ligantes na matriz extracelular. Extraído de http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways.

Esta tese foi dividida em dois capítulos com a finalidade de facilitar sua leitura e compreensão. O primeiro capítulo descreve o isolamento e a caracterização biológica de uma nova SVMP presente no veneno de *Bothrops alternatus*. O segundo capítulo apresenta os estudos dos efeitos sobre a expressão gênica em fibroblastos humanos, de uma desintegrina previamente isolada do mesmo veneno, a alternagina-C.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL: Estudar os efeitos de metaloproteases/desintegrinas sobre a adesão celular e a expressão gênica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Isolar e caracterizar o efeito biológico de uma metaloprotease/desintegrina do veneno de *B. alternatus* sobre a agregação plaquetária, adesão e proliferação celular.
- 2) Determinar os efeitos de uma desintegrina-*like* (alternagina-C) isolada do veneno de *B. alternatus*, sobre a expressão gênica em fibroblastos humanos.

CAPÍTULO 1

O capítulo 1 desta tese descreve a purificação e caracterização biológica da proteína BaG. Ao que tudo indica, a BaG é uma metaloprotease da classe PIII que isolada a partir do veneno bruto da serpente *Bothrops alternatus* e que aparentemente possui duas subunidades com massas moleculares idênticas. A BaG parece interagir com as integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{11b}\beta_3$ uma vez que é capaz de inibir a adesão de células que expressam a integrina $\alpha_5\beta_1$ em suas superfícies ao seu respectivo ligante específico, além de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP. A seguir serão apresentados a metodologia, os resultados e as discussões referentes ao isolamento e caracterização biológica da BaG.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

As resinas cromatográficas de Gelatina-Sepharose 4B e DEAE Sepharose *Fast Flow* foram obtidas da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). O inibidor de metaloproteases 1,10-fenantrolina foi obtido da Sigma (Sant Louis, MO, USA). Células de eritroleucemia humana da linhagem K562, células K562 transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (K562 $\alpha_2\beta_1$) e os anticorpos anti-echistatina e anti- $\alpha_5\beta_1$ foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Stefan Niewiarowski (Thomas Jefferson

University, Philadelphia, USA, *in memoriam*). Os anticorpos anti- αv , anti- β_1 e anti β_3 foram gentilmente cedidos pela prof. Dra. Christina Barja-Fidalgo (Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil). Soro fetal bovino (FBS) e os antibióticos, penicilina e estreptomicina foram obtidos da Cultilab (Campinas, Brasil) e o antifúngico anfotericina B foi obtido da Gibco (Carlsbad, CA, USA). CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) foi obtida da Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Todos os demais reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico.

Obtenção do veneno

As amostras do veneno liofilizado da serpente *Bothrops alternatus* foram obtidas através do Comitê de Venenos do Instituto Butantan. As amostras recebidas foram imediatamente congeladas a temperatura de -20°C e mantidas desta forma até o momento do uso.

MÉTODOS

Purificação da BaG

Para obtenção da metaloprotease/desintegrina BaG, 50mg do veneno bruto liofilizado da serpente *Bothrops alternatus* foram diluídos em 1ml de tampão Tris-HCl 10mM adicionado de NaCl 100mM e inibidor de metaloproteases 1,10-fenantrolina (concentração final 10mM), pH 8,6.

O uso do inibidor nos processos cromatográficos ocorreu somente quando a BaG era utilizada nos ensaios de atividade biológica aonde se procurava descartar o efeito do domínio proteolítico, como em todos os experimentos de adesão celular e no experimento de agregação plaquetária. Nos ensaios para avaliação da atividade catalítica e da atividade hemorrágica, a purificação da BaG foi realizada sem a presença de 1,10-fenantrolina. A amostra de veneno foi centrifugada (centrífuga Eppendorf 5804R) a 13.000 x g e temperatura de 4°C para a eliminação do material insolúvel e em seguida aplicada a uma coluna (4cm x 1cm) contendo resina de Gelatina-Sepharose 4B em um fluxo de 1ml/min. A eluição das frações adsorvidas à resina foi realizada com tampão Tris-HCl 10mM adicionado de NaCl 1,5M em pH 8,6. As amostras eluídas foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis*) e *western blotting* e também quanto à sua atividade caseinolítica (vide a seguir).

As amostras aderidas à resina de Gelatina-Sepharose 4B e eluídas conforme descrito acima, foram então dialisadas contra tampão de equilíbrio (Tris-HCl 10mM) *overnight* a 4°C de modo a eliminar o excesso de NaCl e inibidor de metaloprotease. Em seguida, as amostras foram aplicadas em coluna (20cm x 1cm) contendo resina de troca aniônica DEAE-Sepharose Fast Flow. As amostras foram eluídas através de gradiente linear de NaCl de 0 a 1M com fluxo de 2,5ml/min. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE e *western blotting* e também

quanto à sua atividade caseinolítica (vide a seguir). As amostras contendo a proteína purificada foram novamente incubadas com 1,10-fenantrolina (10mM) e em seguida dialisadas contra tampão Tris-HCl 10mM *overnight* a 4°C para a eliminação do excesso de NaCl e de inibidor.

Caracterização das proteínas

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras obtidas nos fracionamentos em colunas de afinidade e troca aniônica foram submetidas a SDS-PAGE, de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970), utilizando-se o sistema Mighty Small II (Hoefer). O gel de empilhamento foi preparado em uma concentração de 5% de poliacrilamida, enquanto que no gel de separação utilizaram-se concentrações de 7,5 ou 12,5% de poliacrilamida. O tampão de amostra consistiu de Tris-HCl (0,125 M pH 6,8), dodecil sulfato de sódio (SDS – 4%), azul de bromofenol (0,025%) e glicerol (20%). Para a análise das amostras em condições desnaturantes, adicionou-se ao tampão de amostra o agente redutor β -mercaptoetanol (concentração final 0,1M), capaz de clivar as pontes dissulfeto intra ou intercadeias presentes nas proteínas.

As proteínas foram detectadas por coloração com *Comassie Brilliant Blue R-250* (BioRad) e a massa molecular aparente das proteínas de interesse, foi estimada através de uma curva de calibração utilizando-

se padrões de massa molecular conhecidos, na faixa de 15-220kDa (*Benchmark Protein Ladder* – Gibco). Esta curva foi obtida a partir do logaritmo da massa molecular das proteínas utilizadas como padrões em relação ao quociente da distância percorrida, em milímetros, por estas proteínas e pelo marcador de frente do gel (azul de bromofenol).

Western blotting

Para os ensaios de *western blotting*, as amostras obtidas a partir do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Immobilon-NC HAHY – Millipore) em sistema de transferência MINI-V 8/10 (Gibco). A membrana foi em seguida incubada em separado com anticorpos primários anti-alternagin-C (1:10.000) e anti-echistatina (1:10.000), produzidos em camundongo e coelho, respectivamente. Após a incubação com os devidos anticorpos secundários, a ligação dos mesmos às proteínas presentes na membrana foi revelada utilizando-se o substrato BCIP/NBT (*Fast BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet* – Sigma).

Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteína das amostras foi realizada de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976),

utilizando o *kit* BioRad para determinação de concentração protéica (BioRad *protein assay*).

Análises de espectrometria de massa

Uma amostra (10 μ g) da proteína BaG purificada como descrito anteriormente foi digerida utilizando 1 μ g de tripsina, *overnight* a temperatura ambiente. A amostra foi então acidificada com ácido acético 1% imediatamente antes da análise pelo sistema LC-MS-MS (Finnigan LCQ Ion Trap Mass Spectrometer). A amostra foi injetada e os peptídeos foram eluídos da coluna através de um gradiente de acetonitrila/ácido acético 0-1M em um fluxo de 0,25ml/min. A fonte iônica de *nanospray* foi operada a 2,8kV. A digestão foi analisada utilizando a capacidade do instrumento de adquirir uma varredura completa do espectro de massa para determinar a massa molecular do peptídeo e produzir um espectro iônico para determinar a seqüência de aminoácidos em varreduras seqüenciais. Os dados resultantes foram analisados através de buscas em bases de dados usando o algoritmo de busca *Sequest*, para a identificação da fonte da proteína. Estas análises foram realizadas no laboratório do prof. Dr. Jay W. Fox, (University of Virginia Health System, Charlottesville, VA, USA).

Ensaio de atividade biológica

Atividade caseinolítica

O teste de atividade caseinolítica evidencia a clivagem da caseína por enzimas proteolíticas, fazendo com que os peptídeos resultantes da clivagem permaneçam em suspensão, de tal modo que o sobrenadante obtido após a centrifugação das amostras incubadas com a caseína possa ser medido quanto sua absorvância a 280nm. As proteínas não clivadas precipitam, tornam-se insolúveis, e são separadas do sobrenadante por centrifugação. Os peptídeos clivados pela ação de proteases da amostra, permanecem no sobrenadante após a centrifugação.

Para o ensaio de atividade caseinolítica foram utilizados 25µl de cada amostra das frações eluídas da coluna de Gelatina-Sepharose 4B e da coluna DEAE-Sepharose, obtidas sem a presença de inibidor de metaloproteases. Em seguida, foi adicionado a cada amostra 225µl de uma solução de CaCl₂ 20mM (pH 8,6), ou de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 15mM (concentração final). Posteriormente, adicionou-se 225µl de uma solução de caseína (0,5% em tampão Tris-HCl 10mM, acrescido de NaCl 100mM, pH 8,6). As amostras foram incubadas em banho-maria (37°C) durante 1h. Após este intervalo, a reação foi interrompida pela adição de 500µl de ácido tricloroacético (TCA 15%). Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g,

durante 10min e a absorvância de cada fração foi medida em um comprimento de onda de 280nm.

Determinação da dose hemorrágica mínima (MHD)

Para os ensaios de atividade hemorrágica foi utilizado o protocolo modificado de JOHNSON & OWNBY (1993). Doses de 0,1; 1 e 10µg da proteína BaG sem tratamento com inibidor de metaloprotease (1,10-fenantrolina) e diluídas em um volume de 100µl de tampão PBS (NaCl 140mM, KCl 2,5mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,4mM, pH 7,4) foram injetados sub cutaneamente no dorso de camundongos adultos pesando entre 30 a 35g. Após 4h, os camundongos foram sacrificados, suas peles foram retiradas e o surgimento ou não de pontos hemorrágicos foi analisado. Como controle positivo de atividade hemorrágica foi utilizada a jararagina. A dose hemorrágica mínima é definida como a quantidade de proteína que produz um halo hemorrágico mínimo de 1cm após 4h da injeção, nas condições acima.

Ensaio de agregação plaquetária

Os ensaios de atividade da BaG sobre a agregação plaquetária foram realizados no laboratório do prof. Dr. Jay W. Fox conforme metodologia descrita por JIA *et al.* (1997), com modificações, utilizando-se plasma rico em plaquetas humano (PRP). Além do tratamento com o inibidor de metaloprotease durante as etapas de sua

purificação, a BaG purificada também foi diretamente tratada com 1,10-fenantrolina (concentração final 10mM). Em seguida as amostras de BaG foram dialisadas contra PBS *overnight* a 4°C para a completa eliminação de qualquer possível efeito do inibidor nos ensaios. A BaG foi tratada deste modo com o objetivo de eliminar o efeito do domínio metaloprotease nestes ensaios. A proteína BaG inibida deste modo foi chamada BaG-I.

Amostras de sangue humano obtidas de doador saudável e sem ter ingerido nenhum tipo de medicamento foram coletadas em solução citrato de sódio (3,8%) numa proporção de 1:9 (citrato de sódio/sangue). Em seguida o sangue foi centrifugado por 20 min a 2.000 x g em temperatura ambiente para se obter o PRP. A concentração de plaquetas utilizada nos ensaios foi ajustada para 2×10^5 células/0,5ml. Após a incubação do PRP com diferentes concentrações (5 a 400nM) da BaG-I durante 2min a 37°C sob agitação, a agregação plaquetária foi medida em um agregômetro (Chronolog). Aliquotas de 400µl de suspensão de plaquetas foram induzidas à agregação com o uso do agonista ADP (concentração final 10µM). À máxima resposta de agregação obtida após a adição do ADP na ausência da proteína testada foi dado o valor de 100% de agregação. O valor do IC₅₀ (concentração que representa 50% da inibição da agregação plaquetária pela proteína testada) foi determinado a partir de uma curva concentração-dependente.

Manutenção das linhagens celulares

As células K562 e K562 $\alpha_2\beta_1$ foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media* – Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml) e anfotericina B (250UG/ml) (Gibco) a 37°C com 5% de CO₂ em estufa de cultura celular (*Cellstar*). Para células transfectadas, foi adicionado ao meio de cultura o reagente seletivo geneticina (0,5mg/ml).

Ensaio de inibição da adesão celular

Experimentos de inibição da adesão celular foram realizados de acordo com a metodologia descrita por MARCINKIEWICZ *et al.* (1999a,b), com modificações. As células foram cultivadas em meio DMEM como descrito anteriormente. Para testar a atividade inibitória da BaG-I na adesão celular realizou-se o ensaio de inibição da adesão à fibronectina ou ao colágeno tipo I e células da linhagem K562 ou K562 $\alpha_2\beta_1$.

Placas de 96 poços foram incubadas com 1 μ g/poço de fibronectina de plasma bovino (Invitrogen) dissolvida em tampão de adesão (HEPES 20mM, NaCl 150mM, MgSO₄ 5mM, KCl 5mM, MnCl 1mM, pH 7,35) ou 0,5 μ g/poço de colágeno bovino tipo I (Chronolog) dissolvido em ácido acético 0,1% em água, *overnight* a 4°C. Em seguida os poços foram bloqueados com solução de soro albumina bovina (BSA

1%, Gibco) em tampão de adesão durante 2h a temperatura ambiente. Após o bloqueio, os poços foram lavados três vezes com tampão de adesão e as células (1×10^5 células/poço) marcadas com 5-*chloromethylfluorescein diacetate* (CMFDA concentração final $12,5 \mu\text{M}$), previamente incubadas ou não com as amostras de interesse (BaG-I em diferentes concentrações), foram adicionadas em cada poço. As placas foram então incubadas por mais 30min em banho-maria (37°C). Após a incubação, as células não aderidas foram removidas por aspiração e os poços foram lavados três vezes com tampão de adesão.

Uma solução de lise celular composta de Triton X-100 0,5% em água foi adicionada a cada poço ($100 \mu\text{l}$) e as células foram novamente incubadas por mais 20min em temperatura ambiente e protegidas da luz. O registro da fluorescência das placas foi realizado em fluorímetro (SpectraMAX Gemini XS) com comprimento de onda de 485nm de excitação e 538nm de emissão. Para os controles positivos, utilizou-se somente a incubação das células ao seu substrato específico, sem a adição das amostras a serem testadas e para os controles negativos, o substrato de adesão específico foi substituído por BSA (1% em tampão de adesão). Todos os experimentos foram realizados em triplicata em um mínimo de duas repetições para cada experimento. Em paralelo, uma curva padrão foi preparada na mesma placa utilizando concentrações conhecidas de células marcadas com CMFDA.

Ensaio de promoção da adesão celular e competição com anticorpos

Os ensaios para verificar se a BaG-I era capaz de promover a adesão celular foram realizados utilizando a própria proteína imobilizada nos poços como substrato. Para tal, 10 μ g de BaG-I foi adicionado em uma placa de 96 poços. Posteriormente, as células K562 ou K562 $\alpha_2\beta_1$ (1x10⁵ células/poço) marcadas com CMFDA foram adicionadas aos poços e a placa foi incubada por 30min em banho-maria (37°C) da mesma forma como descrito anteriormente. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com tampão de adesão e as células que permaneceram aderidas foram lisadas com solução de lise celular. A leitura da fluorescência foi realizada em fluorímetro (SpectraMAX Gemini XS) com comprimento de onda de 485nm de excitação e 538nm de emissão. Para os controles positivos, utilizou-se a adesão das células ao seu substrato específico, e para os controles negativos, o substrato de adesão foi substituído por BSA (1% em tampão de adesão). Para o experimento de competição com anticorpos, as células da linhagem K562 foram previamente incubadas durante 30min a temperatura ambiente com os anticorpos anti- $\alpha_5\beta_1$, anti- α_v , anti- β_1 ou anti- β_3 antes de serem adicionadas aos poços. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em um mínimo de duas repetições para cada experimento. Em paralelo, uma curva padrão foi preparada na mesma placa utilizando concentrações conhecidas de células marcadas.

Ensaio de desadesão celular

Para estes ensaios, as células da linhagem K562 (1×10^5 /poço) marcadas com CMFDA conforme descrito anteriormente, foram adicionadas aos poços das placas de 96 poços previamente cobertos com fibronectina ($1 \mu\text{g}/\text{poço}$) e em seguida, incubados por 30min em banho-maria (37°C). Após este período, BaG-I ($4 \mu\text{M}$) foi adicionada aos poços e a placa foi incubada por mais 2h em banho-maria. Decorrido este tempo, as células não aderidas foram removidas por aspiração e os poços foram lavados três vezes com tampão de adesão. A leitura das placas foi realizada como descrito anteriormente. Para os controles positivos as células foram semeadas diretamente sobre seu substrato específico e a adição de BaG-I foi substituída pela adição de tampão de adesão. Para os controles negativos, o substrato de adesão específico foi substituído por BSA (1% em tampão de adesão) e a adição de BaG-I foi também substituída pela adição de tampão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em um mínimo de duas repetições para cada experimento. Em paralelo, uma curva padrão foi preparada na mesma placa utilizando concentrações conhecidas de células marcadas.

Ensaio de proliferação celular

A proteína BaG-I, nas quantidades de 5, 10 e $20 \mu\text{g}$, foi adicionada ao fundo de placas de 96 poços estéreis e as mesmas foram incubadas *overnight* a 4°C . Em seguida, células K562 (5×10^4 células/poço)

foram adicionadas aos poços e incubadas por 24, 48 e 72h a 37°C em 5% de CO₂. Após os diferentes períodos de incubação o meio foi aspirado, os poços foram lavados três vezes com tampão de adesão e as células aderidas foram incubadas com MTT (1mg/ml) (*3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-Diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue* – Sigma) durante 4h a 37°C. O MTT é metabolizado na mitocôndria de células viáveis que formam uma reação produzindo sal de formazan, um precipitado de cor roxa, que pode ser dissolvido em álcool isopropílico. Após o período de incubação das células com MTT, as placas foram retiradas da estufa e o sal de formazan formado foi diluído em isopropanol a 100%. Para os controles, as células foram semeadas diretamente sobre seu substrato específico. Em paralelo foi preparada uma curva padrão com diferentes quantidades de células. A leitura das placas foi registrada em leitor de placa MRX Dinex Revelations com absorvância de 595nm e filtro de 690nm.

Análises estatísticas

Todos os ensaios foram analisados quanto a sua significância estatística. Cada experimento foi repetido no mínimo em duas vezes em triplicata e a média e o erro padrão da média para cada experimento foi determinado. Para a comparação de diferentes concentrações das amostras testadas contra um grupo controle, o teste

estatístico de Dunnett foi utilizado. Os níveis aceitáveis de p foram *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

RESULTADOS

Purificação da BaG

A metaloprotease/desintegrina BaG foi purificada a partir do veneno bruto da serpente *Bothrops alternatus* em coluna com resina de Gelatina-Sepharose 4B. O veneno bruto foi dissolvido em tampão apropriado e aplicado diretamente à coluna e as frações adsorvidas foram eluídas com solução 1,5M de NaCl. As amostras assim eluídas foram testadas quanto a sua atividade caseinolítica na presença ou ausência do quelante de cátions divalentes, EDTA. A figura 5 apresenta o perfil cromatográfico e a atividade caseinolítica das amostras submetidas a este processo inicial de purificação.

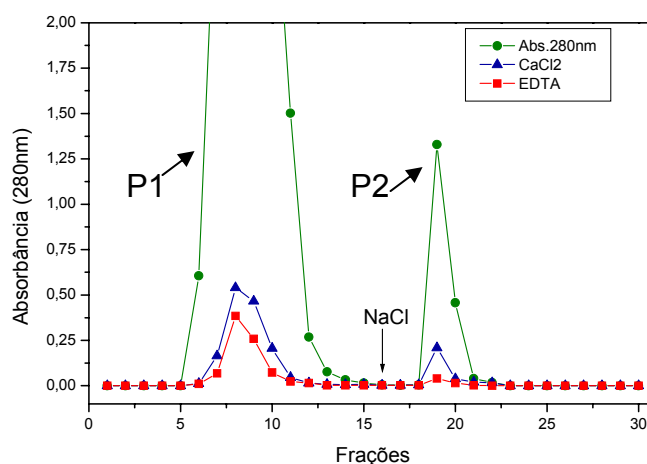


Figura 5 – Perfil cromatográfico das amostras do veneno bruto de *Bothrops alternatus* eluídas da coluna de Gelatina-Sepharose. As amostras eluídas foram testadas com relação a sua atividade caseinolítica na presença de CaCl₂ (linha azul) ou EDTA (linha vermelha).

As amostras eluídas da coluna de Gelatina-Sepharose 4B apresentaram atividade proteolítica sobre a caseína, a qual foi inibida por EDTA, indicando a presença nestas frações de proteases dependentes de cátions divalentes, ou metaloproteases. As frações não adsorvidas à resina (figura 5, amostras correspondentes à fração P1) também apresentaram esta atividade sobre a caseína, indicando a presença de metaloproteases também nestas amostras. Uma vez que o veneno bruto é uma fonte extremamente rica de metaloproteases este resultado não é diferente do esperado.

As amostras adsorvidas à resina e eluídas com alta concentração de NaCl (figura 5, amostras da fração P2), foram então analisadas quanto a seu perfil eletroforético e experimentos de *western blotting* foram realizados, utilizando anticorpos anti-alternagina-C e anti-echistatina. Nestes experimentos, uma proteína com massa molecular de aproximadamente 130kDa reagiu fortemente com anticorpos anti-echistatina. Devido à presença de mais de uma banda protéica no gel de aproximadamente 30kDa (vide figura 7), a qual não reagiu com os anticorpos testados, as amostras foram submetidas a mais um processo cromatográfico, desta vez em resina DEAE-Sepharose, com o objetivo de eliminar este contaminante. O perfil cromatográfico das amostras submetidas a este processo está apresentado na figura 6. As amostras eluídas da coluna DEAE-Sepharose foram também testadas quanto à sua atividade proteolítica sobre a caseína e novamente foram eficazes na

degradação desta proteína. Esta degradação por parte das amostras eluídas, foi completamente inibida pela adição de EDTA, indicando a presença de metaloproteases nestas amostras. Como é possível observar na figura 6, as amostras não adsorvidas à resina (amostras correspondentes à fração P1) também apresentaram atividade proteolítica sobre a caseína, a qual também foi inibida pela incubação com EDTA. Estes resultados denotam a presença de metaloproteases também nas frações não adsorvidas à resina DEAE-Sepharose.

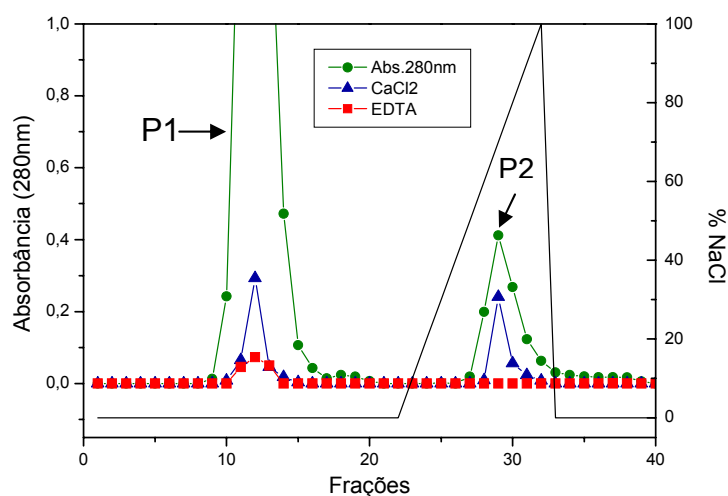


Figura 6 – Perfil cromatográfico das amostras correspondentes à fração P2, eluídas da coluna de Gelatina-Sepharose e aplicadas à coluna DEAE-Sepharose. As amostras eluídas com gradiente linear de NaCl (0 a 1M) (linha preta) foram testadas com relação a sua atividade caseinolítica na presença de CaCl_2 (linha azul) ou EDTA (linha vermelha).

As amostras correspondentes à fração P2, eluídas neste processo cromatográfico, foram submetidas à análise por SDS-PAGE e

western blotting, apresentados na figura 7. Após análise das amostras provenientes destes processos cromatográficos em SDS-PAGE foi possível detectar a presença de duas proteínas majoritárias, com massas moleculares de aproximadamente 130kDa e 30kDa (condições não-redutoras) e 55kDa e 30kDa (condições redutoras) nas frações adsorvidas à resina de Gelatina-Sepharose (figura 7A, linhas 2 e 6). Após o segundo passo cromatográfico em resina DEAE-Sepharose, foi possível a obtenção isolada da proteína de interesse com massa molecular de 130kDa, que em condições redutoras apresentou comportamento migratório distinto, apresentando uma massa molecular de aproximadamente 55kDa (figura 7A, linhas 3 e 7), sugerindo uma estrutura dimérica para esta molécula. A proteína com massa molecular de 130kDa reagiu fortemente contra anticorpos anti-echistatina (figura 7B, linha 2) mas não reagiu contra anticorpos anti-alternagina-C (figura 7C, linha 2). Quando a BaG foi previamente incubada com agente redutor, a capacidade de reconhecimento e ligação aos anticorpos anti-echistatina foi perdida (resultados não apresentados), fato que indica uma dependência conformacional para a ligação da proteína aos anticorpos anti-echistatina. A BaG representa um mínimo de 0,2% do conteúdo total de proteínas do veneno de *B. alternatus*, uma vez que 0,1mg de BaG foi isolada a partir de 50mg de veneno bruto.

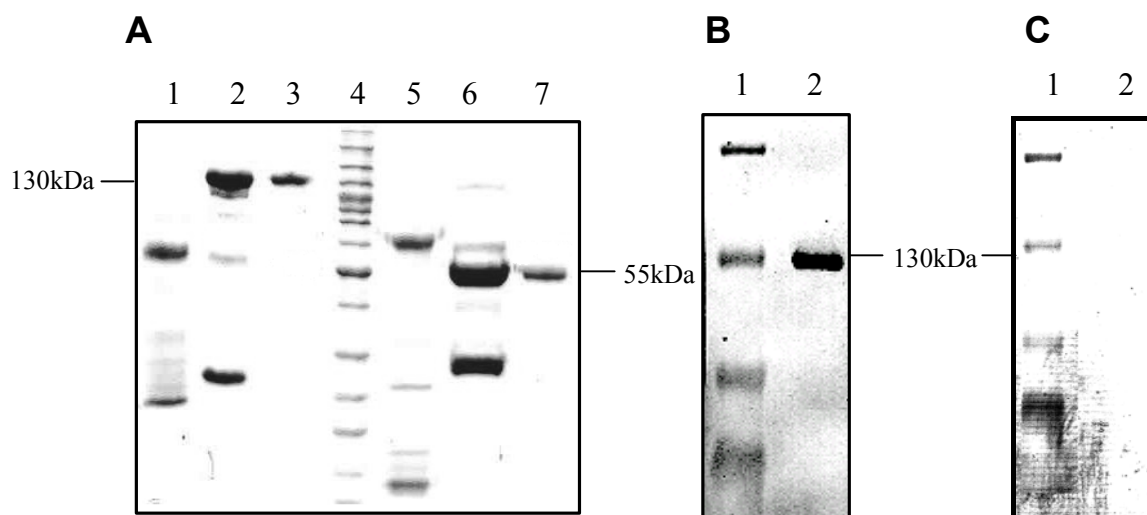


Figura 7 – Purificação da BaG. (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) das amostras eluídas das colunas de Gelatina-Sepharose e DEAE-Sepharose. Linhas (1 e 5) veneno bruto (5 μ g) em condições não redutoras e redutoras, respectivamente, linhas (2 e 6) amostras correspondentes à fração P2, eluídas da coluna de Gelatina-Sepharose em condições não redutoras e redutoras, respectivamente, linhas (3 e 7), amostras correspondentes à fração P2, eluídas da coluna DEAE-Sepharose em condições não redutoras e redutoras, respectivamente, linha (4) Marcador de massa molecular (Bench Mark Protein Ladder – Gibco), (B) As amostras foram aplicadas em um gel (7,5%) e transferidas para membrana de nitrocelulose a qual foi incubada com soro anti-echistatina (1:10.000) ou (C) anti-alternagina-C (1:10.000). Linha (1) Marcador de massa molecular pré-corado (Bench Mark Protein Ladder – Gibco), linha (2) BaG purificada e em condições não redutoras.

Análises da seqüência da BaG

De posse da proteína purificada, análises para determinação de sua seqüência N-terminal foram realizadas, porém, observou-se que

esta região se apresentava bloqueada provavelmente por um resíduo de ácido piroglutâmico, impossibilitando tais procedimentos. A BaG foi então clivada com tripsina e analisada em cromatografia líquida seguida de espectroscopia de massa (LC-MS-MS). Os fragmentos obtidos através da clivagem com tripsina foram seqüenciados e comparados com outras metaloproteases de venenos de serpente (SVMPs) descritas na literatura. A figura 8 representa os resultados obtidos nestas análises.

A comparação das seqüências obtidas através da degradação da BaG com seqüências de outras metaloproteases de venenos de serpente (SVMPs) mostrou que a mesma possui homologia com as SVMPs de classe PIII tais como a metaloprotease de *Gloydius halys*, a Atrolisina A de *Crotalus atrox*, a jararagina e a bothropasina de *Bothrops jararaca* e a ACLD de *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Os peptídeos P1 a P4 obtidos, correspondem à seqüência interna do domínio metaloprotease das SVMPs e o peptídeo P5 foi idêntico ao encontrado no domínio rico em cisteína das SVMPs de classe PIII, indicando que a BaG possivelmente pertence a esta classe das metaloproteases de venenos.

	110 120 130 140 150
G. halys	DHCYYHGRIE NDADSTRSIS ACNGLKGFHK LQGETYLIEP LKLSDSEAHA
Atrolysin A	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
Jararhagin	DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGYFK LQRETYFIEP LKLPDSEAHA
Bothropasin	DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGFHK LQRETYFIEP LKLSNSEAHA
ACLD	DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGFHK LQGEMYLIDP LKLPDSEAHA
BaG	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
	P1 P2
	***: * : : . . : * * * : ** * _ ** * _ . * * * * * * * * * : * *

	260 270 280 290 300
G. halys	IWSNGDKITV TPNVDDTLSS FAEWRKTHLL TRFKHDNAQL LTAIDFNGPT
Atrolysin A	IWSNGDLIDV TSAANVTLKS FGNWRVTNLL RRSKHDNAQL LTAIDLDEET
Jararhagin	IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL TRFKHDNAQL LTAIDFNGPT
Bothropasin	IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL TRFKHDNAQL LTAIDFNGPT
ACLD	IWSDKDKFNM TSAANVTSIS FRNWRATDLL RRSKHDNAQL LTVIDFDGPT
BaG	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
	P3
	: * * : : ** . ** * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

	310 320 330 340 350
G. halys	IGYAYIASMC HPKRSVGIQV DYSPINLVLS VVMAHEMGMH LGIHHDHSYC
Atrolysin A	LGLAPLGTMC DPKLSIGIVQ DHSPINLLVA VTMAHELGMH LGMVHDENRK
Jararhagin	IGYAYIGSMC HPKRSVGIQV DYSPINLVVA VIMAHMGMH LGIHHD TGSC
Bothropasin	IGYAYIGSMC HPKRSVAIVE DYSPINLVVA VIMAHMGMH LGIHHD TDFC
ACLD	IGKAYMASMC DPKRSVGIIQ DHSTINLMMV VTMAHEMGMH LGMDHDEKYC
BaG	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
	P4
	** : * : *

	560 570 580 590
G. halys	CAPEDVKCCR LYCRDNSPGQ NNPCRMFYSN EDEHKGMVLP GTKCG
Atrolysin A	CAQEDVKCCR LFCNWN---- DFLCRHKYSD D----GMVDH GTKCA
Jararhagin	CAPEDVKCCR LYCRDNSPGQ NNPCRMFYSN DDEHKGMVLP GTKCA
Bothropasin	CAPEDVKCCR LYCRDNSPGQ NNPCRMFYSN DDEHKGMVLP GTKCA
ACLD	CAPQDIRCCR LYCFRNLPQG KNICSVIYTP TDEDIGMVLP GTKCE
BaG	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
	P5

Figura 8 – Comparação da seqüência parcial de aminoácidos da BaG com outras metaloproteases de venenos de serpente. *G. halys*, metaloprotease de *Glodius halys*, Atrolisina A, de *Crotalus atrox*, Jararagina e Bothropasina, de *Bothrops jararaca* e ACLD, de *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Os intervalos entre os peptídeos foram inseridos para obtenção do grau máximo de similaridade. Os números no topo indicam o número de resíduos na proteína. O símbolo (*) indica posições com resíduos totalmente conservados, (:) indica que um dos seguintes grupos é totalmente conservado: STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW, (.) indica que um dos seguintes grupos é totalmente conservado: CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, FVLIM, HFY. P1 – P5 representam os peptídeos obtidos após a clivagem da BaG com tripsina.

Análise da atividade hemorrágica da BaG

A BaG foi testada em experimentos de atividade hemorrágica. Em tais experimentos, diferentes concentrações (0,1, 1 e 10 μ g/0,1ml) de BaG foram aplicados sub cutaneamente no dorso de camundongos adultos. Nestes procedimentos, todas as etapas de purificação da BaG foram realizadas na ausência de inibidor de metaloprotease 1,10-fenantrolina, na tentativa de detectar o efeito do domínio catalítico da BaG na hemorragia. Após um período de 4h de aplicação da BaG os animais foram sacrificados e sua pele foi retirada à procura de pontos hemorrágicos. Contudo, após o período de incubação, verificou-se que nenhuma das concentrações de BaG testadas foi capaz de promover a formação de halos hemorrágicos. A BaG foi considerada portanto como uma metaloprotease da classe PIII não hemorrágica nas concentrações testadas.

Atividade de inibição da agregação plaquetária

A BaG foi também testada quanto a sua habilidade em inibir a agregação plaquetária. Para tal, todos os passos cromatográficos envolvidos em sua purificação foram realizados na presença do inibidor de metaloproteases 1,10-fenantrolina com o objetivo de eliminar o efeito do domínio catalítico nestes ensaios. Além disso, a própria proteína purificada foi tratada com este inibidor. Após tal tratamento, a proteína

purificada foi dialisada contra PBS antes de ser utilizada nos ensaios, de modo a eliminar do excesso de inibidor. A BaG assim tratada (BaG-I) foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP em PRP (plasma rico em plaquetas) humano com um IC_{50} de 180nM, conforme demonstra a linha tracejada da figura 9.

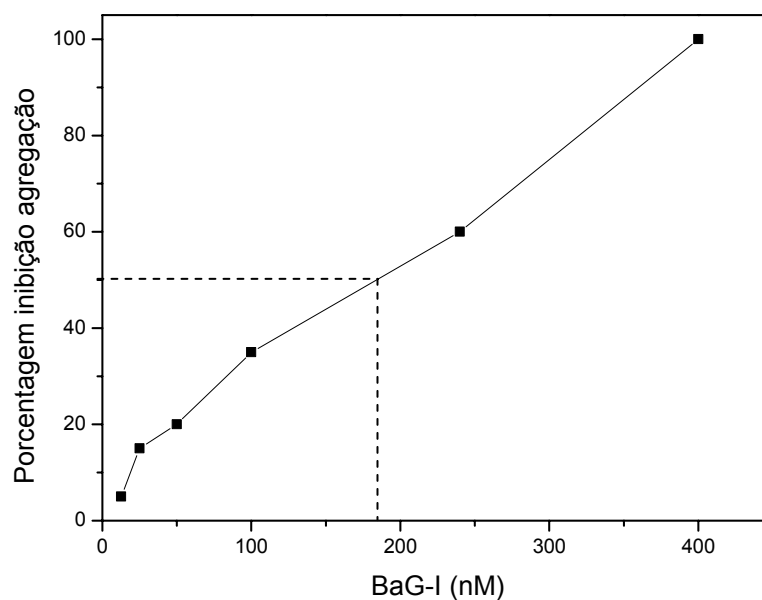


Figura 9 – Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP pela BaG-I. O plasma rico em plaquetas (PRP) humano (2×10^5 células/0,5ml) foi incubado por 2min a 37°C sob constante agitação com as concentrações indicadas de BaG-I (5 a 400nM). Em seguida, após a adição do ADP (10 μ M) a atividade inibitória da adesão foi registrada em agregômetro. A resposta máxima de agregação obtida após a adição de ADP sem prévia adição de BaG-I foi considerada como 100% de agregação. O valor de IC_{50} determinado a partir da curva dose-resposta foi de aproximadamente 180nM (linha tracejada).

Uma vez que o domínio metaloprotease estava inibido pela ação da 1,10-fenantrolina, esta atividade foi provavelmente desencadeada pela ação dos domínios desintegrina e rico em cisteína da BaG-I que estariam interagindo com a integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ na superfície das plaquetas e impedindo desta forma, sua agregação. Contudo, não foi possível determinar através destes ensaios qual domínio estaria especificamente interagindo com a integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ na superfície das plaquetas. Experimentos com os domínios isolados poderiam esclarecer tal questão.

Ensaio de inibição da adesão celular

A BaG-I também foi testada em ensaios de inibição da adesão celular. A figura 10 apresenta os resultados obtidos nestes experimentos. A BaG-I foi capaz de inibir a adesão de células da linhagem K562 à fibronectina (Figura 10A), porém não foi capaz de inibir a adesão de células desta mesma linhagem transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (K562 $\alpha_2\beta_1$) ao colágeno tipo I (Figura 10B). Nestes experimentos, a BaG-I foi previamente incubada com células marcadas e logo em seguida as mesmas foram semeadas sobre os poços cobertos com o ligante específico para cada tipo celular (fibronectina ou colágeno tipo I). Em seguida, a placa foi incubada e após este intervalo, foi lavada para a eliminação das células não aderidas.

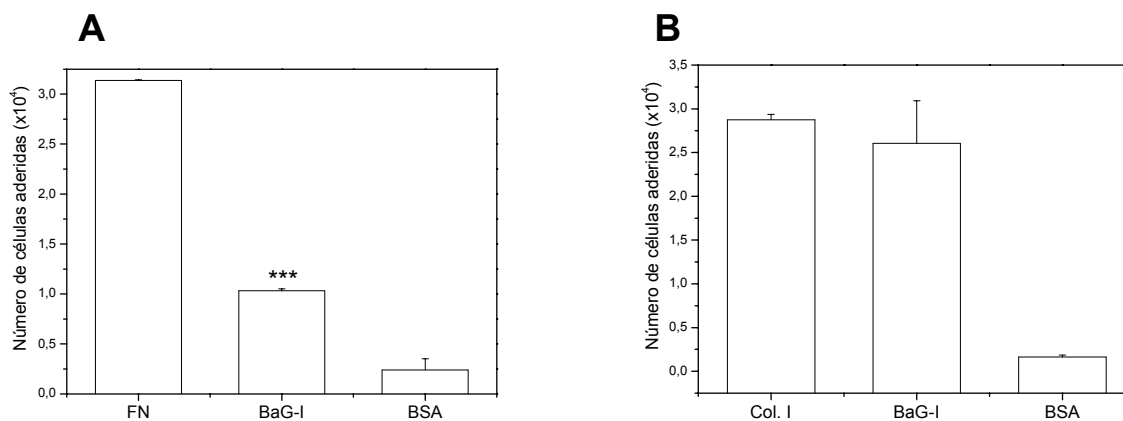


Figura 10 – Inibição da adesão celular pela BaG-I. A BaG inibe a adesão mediada por fibronectina (A) mas não inibe a adesão mediada por colágeno tipo I (B). Fibronectina ou colágeno tipo I (1 e 0,5 μ g/poço, respectivamente) foram imobilizados overnight a 4°C em placas de 96 poços em tampão de adesão. Após o bloqueio dos poços com BSA 1%, as células K562 ou K562 transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ marcadas com CMFDA (1x10⁵ células/poço) na presença ou ausência de BaG-I (4 μ M/poço) foram adicionadas em cada poço e incubadas a 37°C por 30min. Após lavagem as células restantes foram lisadas e placa foi lida em fluorímetro. Células incubadas na ausência de BaG foram consideradas como controle positivo (100% de adesão) e BSA como controle negativo da adesão. As barras de erro indicam o erro padrão das amostras em triplicata ***($p < 0,001$).

Os resultados indicam que a BaG-I é capaz de inibir a adesão celular mediada por fibronectina, uma vez que quando previamente incubada com células K562, impediu que as mesmas aderissem a este substrato. Novamente, a atividade do domínio metaloprotease nestes ensaios pode ser descartada devido ao tratamento

desta proteína com inibidor de metaloprotease. Portanto, o efeito inibitório na adesão das células à fibronectina é muito provavelmente desempenhado pelos domínios desintegrina e/ou rico em cisteína presentes na BaG-I. As células K562 expressam em suas membranas, grandes quantidades da integrina $\alpha_5\beta_1$ (NATH et al., 1999), o que poderia indicar uma certa especificidade da BaG-I para esta integrina.

Determinação do IC₅₀ da adesão celular

Com base nos resultados de inibição da adesão celular, uma curva de inibição com diferentes concentrações de BaG-I foi construída (figura 11). Concentrações de 1, 2, 4 e 6 μM de BaG-I foram testadas e verificou-se um efeito concentração-dependente na inibição da adesão das células à fibronectina, pela BaG-I. O IC₅₀ determinado a partir da curva dose-resposta foi de aproximadamente 3,65 μM , conforme demonstra a linha tracejada da figura 11.

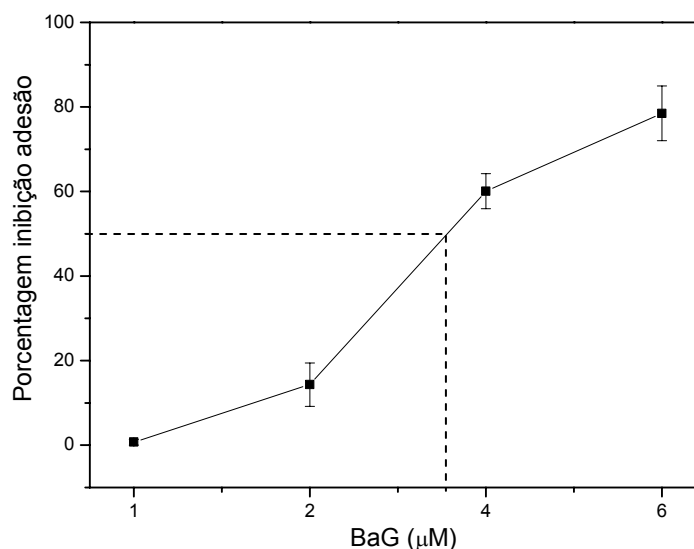


Figura 11 – Determinação do IC₅₀ da atividade de inibição de adesão das células da linhagem K562 à fibronectina pela BaG-I. O valor de IC₅₀ determinado a partir da curva dose-resposta foi de aproximadamente 3,65 μM (linha tracejada).

Promoção da adesão

A BaG-I também foi testada quanto sua capacidade de promover a adesão das células K562 (figura 12A) e K562 $\alpha_2\beta_1$ (figura 12B). Para tal, a BaG-I foi imobilizada nos poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, células marcadas com CMFDA foram adicionadas aos poços e a placa foi então novamente incubada. Após lavagens para eliminar as células não aderidas, a quantidade de células restante nos poços foi determinada. A BaG-I foi capaz de promover a adesão de

células K562 mas não foi capaz de promover a adesão das células K562 $\alpha_2\beta_1$.

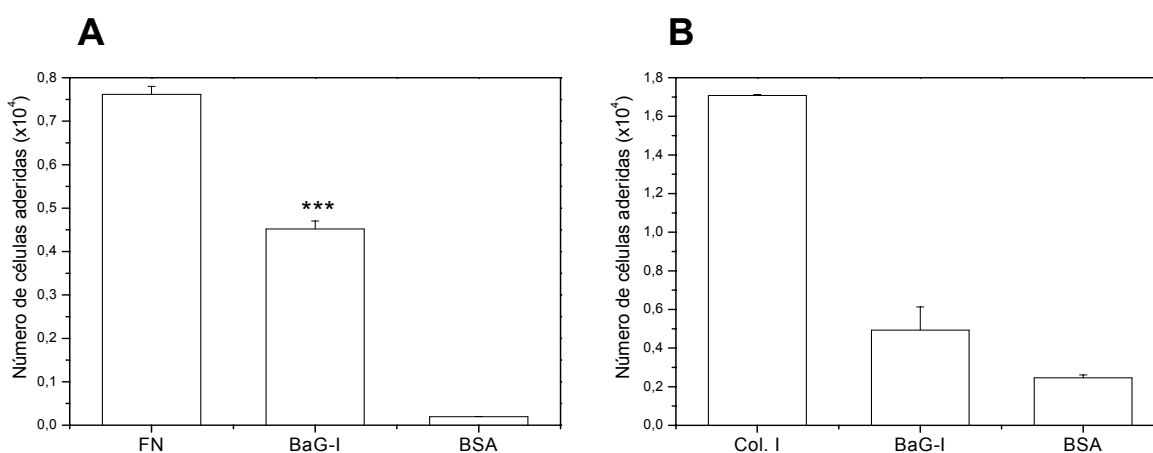


Figura 12 – Promoção da adesão celular pela BaG-I. A BaG-I promove a adesão das células K562 (A) mas não promove a adesão das células K562 $\alpha_2\beta_1$ (B). A BaG-I (10 μ g/poço) foi imobilizada overnight a 4°C em placas de 96 poços em tampão de adesão. Após o bloqueio dos poços com BSA 1%, as células K562 ou K562 transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ marcadas com CMFDA (1x10⁵ células/poço) foram adicionadas em cada poço e incubadas a 37°C por 30min. Após lavagem as células restantes foram lisadas e placa foi lida em fluorímetro. Fibronectina e colágeno tipo I foram utilizados como controles positivos da adesão e BSA como controle negativo da adesão. As barras de erro indicam o erro padrão das amostras em triplicata ***($p < 0,001$).

Estes resultados indicam novamente uma especificidade de ligação para o domínio desintegrina (e/ou rico em cisteína) da BaG-I. Uma vez que a quantidade de receptores $\alpha_2\beta_1$ na membrana das células K562 $\alpha_2\beta_1$ é muito maior que nas células da linhagem não transfectada

com esta integrina e uma vez que as células K562 possuem grandes quantidades da integrina $\alpha_5\beta_1$ (NATH *et al.*, 1999) é plausível postular que o domínio desintegrina (e/ou rico em cisteína) da BaG-I liga-se com maior especificidade a esta integrina.

De posse destes resultados, experimentos para bloquear algumas integrinas presentes na membrana das células em estudo foram realizados, na tentativa de elucidar a especificidade do domínio desintegrina da BaG. Para tal, utilizou-se anticorpos anti- $\alpha_5\beta_1$, anti- β_1 , anti- α_v e anti- β_3 . Nestes experimentos, somente as células K562 não transfectadas foram previamente incubadas com os anticorpos citados acima e então adicionadas sobre os poços cobertos com a BaG-I imobilizada, com o objetivo de verificar se o bloqueio destes receptores poderia interferir na adesão das células à BaG-I. Os resultados obtidos nestes ensaios estão apresentados na figura 13.

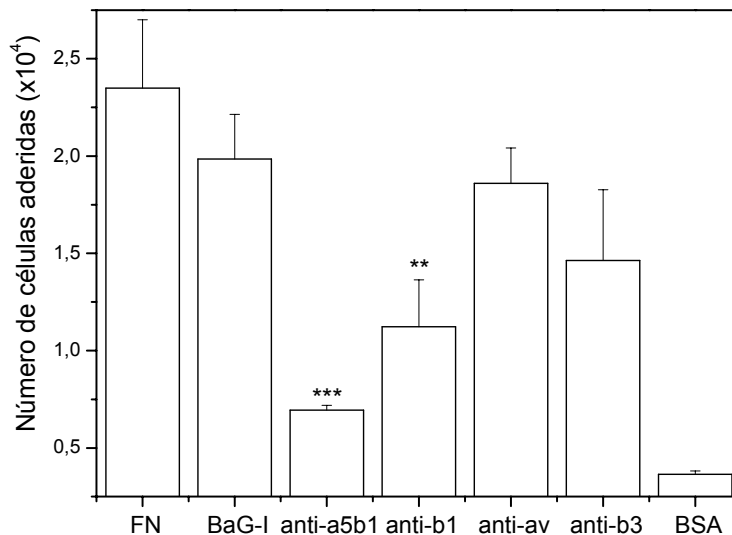


Figura 13 – Especificidade de ligação da BaG-I. A BaG-I (10 μ g/poço) foi imobilizada *overnight* a 4°C em placas de 96 poços. Após o bloqueio dos poços com BSA 1%, as células K562 marcadas com CMFDA (1x10⁵ células/poço) e previamente incubadas com os anticorpos anti- $\alpha_5\beta_1$, anti- β_1 , anti- α_v ou anti- β_3 foram adicionadas em cada poço e incubadas a 37°C por 30min. Após lavagem as células restantes foram lisadas e placa foi lida em fluorímetro. Fibronectina foi utilizada como controle positivo da adesão e BSA como controle negativo. As barras de erro indicam o erro padrão das amostras em triplicata ***($p < 0,001$), **($p < 0,01$).

De fato, a incubação com anticorpos específicos foi eficaz na inibição da adesão das células K562 à BaG-I imobilizada. Quando as células foram previamente incubadas com os anticorpos anti- $\alpha_5\beta_1$, observou-se uma diminuição na adesão das mesmas à BaG-I imobilizada na placa, o que novamente indica a especificidade do domínio desintegrina da BaG-I para a integrina $\alpha_5\beta_1$.

Quando estas mesmas células são incubadas com anticorpos produzidos contra a subunidade β_1 (anti- β_1) das integrinas ainda observa-se uma diminuição da adesão das mesmas à BaG-I, porém, o efeito não é tão potente quanto o observado com células tratadas com anticorpos anti- $\alpha_5\beta_1$. Entretanto, quando as células são previamente incubadas com anticorpos anti- α_v ou anti- β_3 não há diminuição significativa na adesão das mesmas à BaG-I imobilizada (figura 13). Pode-se concluir, a partir dos experimentos de adesão celular e agregação plaquetária, que o domínio desintegrina da BaG-I, é capaz de interagir com, no mínimo, duas integrinas, a $\alpha_5\beta_1$ presente na membrana das células K562 e a $\alpha_{IIb}\beta_3$, presente na superfície das plaquetas.

Desadesão celular

A BaG-I também foi testada quanto à sua capacidade de desaderir células da linhagem K562 previamente ligadas à fibronectina imobilizada (figura 14). Para tal, os poços de uma placa de 96 poços foram previamente cobertos com fibronectina e em seguida células K562 foram deixadas aderir. Passado o tempo de incubação a BaG-I foi adicionada aos poços e seu efeito na desadesão foi analisado. A BaG-I foi capaz de promover significativamente a desadesão das células K562 já previamente aderidas à fibronectina.

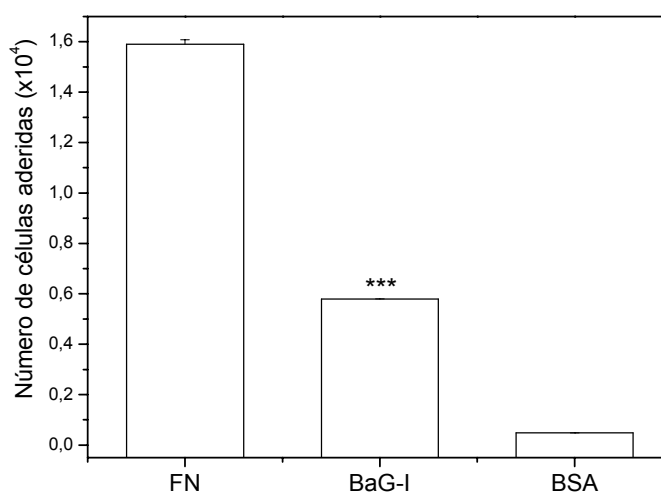


Figura 14 – Desadesão das células K562 pela BaG-I. Células K562 marcadas com CMFDA (1×10^5 células/poço) foram adicionadas aos poços previamente cobertos *overnight* a 4°C com fibronectina (1µg/poço) e bloqueados com BSA 1%. As placas foram incubadas a 37°C por 30min e em seguida BaG-I (4µM/poço) foi adicionada a cada poço e a placa foi novamente incubada a 37°C por 2h. Após lavagem as células restantes foram lisadas e placa foi lida em fluorímetro. Células incubadas na ausência de BaG foram utilizadas como controle positivo da adesão e BSA como controle negativo da adesão. As barras de erro indicam o erro padrão das amostras em triplicata ***($p < 0,001$).

Estes resultados indicam que a BaG-I é capaz de competir com a fibronectina pela ligação com a integrina $\alpha_5\beta_1$. Uma vez que a interação desta proteína da ECM com tal integrina ocorre através de seqüências RGD distribuídas em sua estrutura, é coerente postular que o

domínio desintegrina presente na BaG-I possui um motivo RGD, o qual estaria competindo com a fibronectina para a ligação a integrina $\alpha_5\beta_1$ na membrana das células da linhagem K562.

Proliferação celular

A BaG-I também foi testada quanto à sua atividade na proliferação celular (figura 15). Diferentes quantidades (5, 10 e 20 μ g/poço) de BaG-I foram imobilizadas nos poços de uma placa de 96 poços e células da linhagem K562 foram adicionadas e incubadas em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72h). Em todas as concentrações e tempos testados, a BaG-I foi capaz de diminuir o número de células K562 viáveis.

Tais resultados indicam portanto que a BaG-I, apesar de ser capaz de promover a adesão das células K562, não fornece sinais de sobrevivência suficientes capazes de manter a viabilidade destas células por períodos longos de tempo. Ou ainda, após a ligação do domínio desintegrina da BaG-I com a integrina $\alpha_5\beta_1$ presente na membrana destas células, um processo de sinalização que poderia ativar mecanismos responsáveis pela inibição da proliferação celular ou a ativação de cascatas apoptóticas seria iniciado.

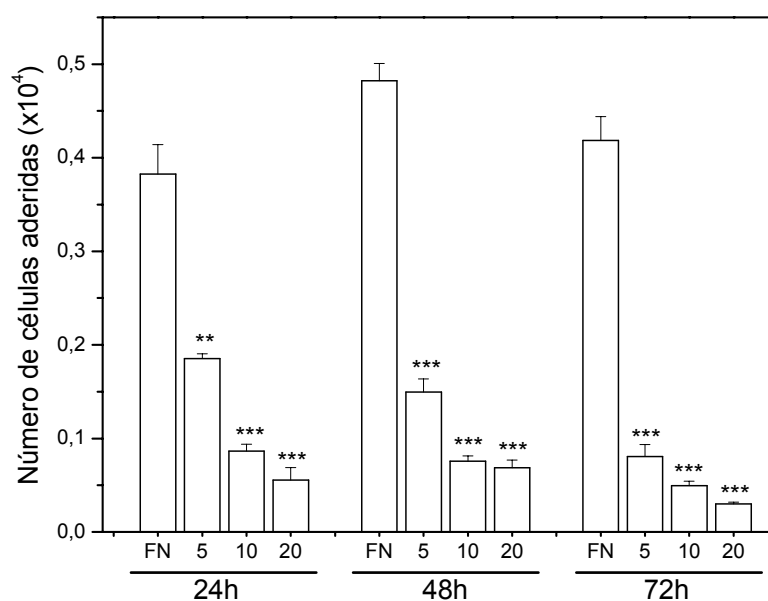


Figura 15 – Inibição da proliferação de células da linhagem K562 pela BaG-I. Quantidades de 5, 10 e 20 μg /poço de BaG-I foram imobilizadas overnight a 4°C nos poços de placas de 96 poços. Após o bloqueio dos poços com BSA 1%, células da linhagem K562 (5×10^4 células/poço) em meio DMEM foram adicionadas aos poços incubadas por 24, 48 ou 72h a 37°C e 5% de CO_2 . Após o período de incubação o meio foi aspirado e as células aderidas foram incubadas com MTT (1mg/ml) durante 4h a 37°C. Em seguida, as placas foram retiradas da estufa e o sal de formazan formado foi diluído em isopropanol. Em paralelo foi preparada uma curva padrão com diferentes quantidades de células. A leitura das placas foi registrada em leitor de placa MRX Dinex Revelations com absorvância de 595nm e filtro de 690nm.

DISCUSSÃO

Este trabalho reporta o isolamento e a caracterização de uma metaloprotease/desintegrina, BaG, a partir do veneno bruto da serpente *Bothrops alternatus*. A BaG foi assim denominada para identificar o gênero e a espécie da qual a proteína foi extraída (**B** = *Bothrops*, **a** = *alternatus*) e o principal processo cromatográfico utilizado em sua purificação (**G** = Gelatina-Sepharose). A caracterização biológica da BaG incluiu a investigação sobre suas atividades na degradação proteolítica da caseína e atividades hemorrágica, inibidora da agregação plaquetária, inibidora da adesão e da proliferação celular, além de sua atividade na promoção e desadesão celular.

A BaG foi purificada em dois passos cromatográficos, sendo que o primeiro caracterizou-se pela utilização de uma resina de Gelatina-Sepharose. Esta resina foi empregada para a purificação da BaG com base em suas propriedades estruturais, uma vez que a Gelatina é formada por moléculas desnaturadas de colágeno e pode interagir com moléculas presentes na matriz extracelular (ECM) como a fibronectina. De fato, a resina de Gelatina-Sepharose é comumente utilizada para a purificação fibronectina plasmática de diferentes espécies (VUENTO *et al.*, 1977; VUENTO & VAHERI, 1979; SMILENOV *et al.*, 1992). A fibronectina por sua vez é uma proteína da ECM presente no tecido conectivo, parede de vasos sanguíneos e membranas basais. Ela pode se apresentar na forma fibrilar ou em associação com outras proteínas como

o colágeno, e ainda na forma solúvel circulante no plasma. A fibronectina apresenta em sua estrutura a seqüência RGD como principal sítio de adesão celular (ROMBERGER, 1997). Desta forma, a estratégia de purificação da BaG – baseada na resina de Gelatina-Sepharose – foi adotada supondo-se que proteínas apresentando motivos de ligação celular similares aos da fibronectina pudessem interagir com a resina, sendo assim isoladas dos demais componentes do veneno. Para evitar a degradação da resina pelas proteases presentes no veneno este último era tratado com inibidor de metaloprotease antes de ser aplicado à coluna, exceto quando ensaios para determinar o efeito do domínio proteolítico eram realizados.

A aplicação do veneno bruto de *B. alternatus* na coluna Gelatina-Sepharose resultou na adsorção à resina de uma fração protéica detectada através da absorvância óptica em comprimento de onda de 280nm. Esta fração apresentou atividade proteolítica sobre a caseína, a qual foi inibida pelo tratamento com EDTA. Após análise em SDS-PAGE foi possível detectar a presença de duas proteínas majoritárias, com massas moleculares de 130kDa e 30kDa (condições não-redutoras) nas frações adsorvidas à resina de Gelatina-Sepharose. Em condições redutoras, ou seja, na presença do agente β -mercaptoetanol, a proteína de 130kDa apresentou um comportamento migratório distinto em SDS-PAGE, com massa molecular de aproximadamente 55kDa. Somente a banda protéica com massa molecular de 130kDa reagiu com anticorpos

anti-echistatina (desintegrina-RGD) em análises de imunodeteção. O não reconhecimento das bandas protéicas da BaG tratada com agente redutor poderia indicar uma dependência conformacional para a reação com os anticorpos anti-echistatina. A reação com estes anticorpos poderia indicar a presença de seqüências RGD na estrutura da BaG.

Um segundo passo cromatográfico em resina de troca aniônica DEAE-Sepharose foi empregado para a purificação final da proteína de interesse. Após este procedimento a BaG foi isolada com sucesso e novamente testada quanto sua atividade caseinolítica, a qual foi novamente constatada, sendo que tal atividade foi também inibida pela ação do EDTA.

Tais resultados apontam para a natureza de metaloprotease desta proteína, uma vez que o EDTA age como quelante de cátions divalentes, os quais são fundamentais para a atividade desta classe de proteases. Como já citado na introdução deste trabalho, as proteínas presentes nos venenos de serpente pertencem a duas classes principais, as serino e as metaloproteases. Estas últimas são caracterizadas pela presença de um cátion de zinco (Zn^{2+}) em seu sítio ativo catalítico, o que o torna estável para agir sobre seu substrato. Se o Zn^{2+} é eliminado da estrutura da metaloprotease, toda sua conformação a de seu sítio ativo é desestruturada e conseqüentemente, sua atividade biológica é perdida. De fato, estudos de dicroísmo circular realizados antes e após a remoção do Zn^{2+} por quelantes, indicam uma grande diminuição no conteúdo de α -

hélices da estrutura destas metaloproteases (BJARNASON & FOX, 1994), o que comprova a importância deste metal para sua atividade biológica. Além disso, a presença de um íon cálcio (Ca^{2+}) na superfície da molécula oposta a fenda do sítio ativo também proporciona estabilidade estrutural às SVMPs (GOMIS-RUTH *et al.*, 1993), sendo que o tratamento com EDTA poderia também interferir com esta estabilidade.

Os dados descritos acima apontam para pistas de que a BaG poderia possuir em sua estrutura os domínios metaloprotease (inibição da atividade proteolítica por EDTA) e desintegrina (reação com anticorpos anti-echistatina), que estariam organizados em mais de uma subunidade, uma vez que a presença do agente redutor provocou a migração protéica alterada em SDS-PAGE. A somatória das massas moleculares da proteína tratada com agente redutor (55kDa) coincide aproximadamente com a massa molecular da proteína não tratada (130kDa). A BaG seria portanto um dímero formado por subunidades com massas moleculares idênticas de aproximadamente 55kDa.

Análises para determinação da seqüência peptídica N-terminal da proteína purificada foram realizadas através da transferência da banda com massa de 130kDa para membrana de PVDF. Contudo, a região N-terminal da BaG se apresentou bloqueada por um resíduo de glutaminil ciclizado (ácido piroglutâmico) – aspecto característico de muitas metaloproteases de venenos de classe PIII – o que impossibilitou a realização de tais análises.

Devido ao relativo baixo rendimento de purificação da BaG, agravado pela aparente escassez desta proteína no veneno bruto, não foi possível realizar análises para separação e determinação da seqüência peptídica completa de suas cadeias ou subunidades individuais. Contudo, análises de sua seqüência parcial foram realizadas através de cromatografia líquida seguida por espectroscopia de massa. A BaG foi clivada em vários peptídeos menores, os quais foram seqüenciados e comparados com outras metaloproteases de venenos de serpente (SVMPs). Os peptídeos internos resultantes da clivagem com tripsina apresentaram de fato, homologia com SVMPs da classe PIII como a metaloprotease isolada do veneno de *Glodius halys*, atrolisina A, jararagina, bothropasina e ACLD. Um peptídeo em especial, P5, foi homólogo ao domínio rico em cisteína de SVMPs da classe PIII, o que permitiu classificar a BaG como uma SVMP que possui, no mínimo, os domínios metaloprotease/desintegrina(-like)/rico em cisteína. Ensaio de hemaglutinação foram também realizados na tentativa de detectar a presença de um domínio lectina em sua estrutura – domínio característico das SVMP da classe PIV – contudo a BaG não apresentou atividade aglutinante no modelo experimental testado (resultados não apresentados).

A classificação da BaG como uma SVMP da classe PIII pareceu controverso uma vez que a mesma reagiu fortemente com anticorpos produzidos contra uma desintegrina-RGD (echistatina) e não

reagiu contra anticorpos produzidos contra uma desintegrina-*like* (alternagina-C). Como se sabe, as desintegrinas-RGD são derivadas da classe PII e as desintegrinas-*like* por sua vez, são derivadas da classe PIII das SVMPs. Por possuir homologia com SVMPs da classe PIII, é de se supor que a seqüência adesiva RGD não estivesse presente na BaG. Entretanto, reações cruzadas são susceptíveis de ocorrer em experimentos de *western blotting*, o que poderia explicar tal controvérsia.

A maioria das SVMPs homólogas à BaG pertence a classe PIII e apresenta atividade hemorrágica. A atrolisina A, isolada do veneno de *Crotalus atrox*, é uma SVMP PIII com potente atividade hemorrágica (BJARNASON & FOX, 1994). A jararagina (PAINE *et al.*, 1992) e a bothropasina (ASSAKURA *et al.*, 2003), presentes no veneno de *B. jararaca*, também são metaloproteases hemorrágicas da classe PIII e apresentam atividade proteolítica inibida por compostos quelantes de metais. Entretanto, a BaG não foi capaz de produzir atividade hemorrágica na pele de camundongos, mesmo quando testada em grandes quantidades (10µg), o que a caracteriza como uma SVMP PIII não hemorrágica.

As metaloproteases não hemorrágicas dos venenos de serpente são capazes de degradar componentes da membrana basal sem contudo induzir a hemorragia (MARKLAND, 1998). Porém, a grande maioria das SVMPs não hemorrágicas isoladas dos venenos de serpente pertence à classe PI. A lebetase, presente no veneno de *Vipera lebetina* é

a única metaloprotease não hemorrágica da classe PIII já descrita na literatura (SIIGUR & SIIGUR, 1991; SIIGUR *et al.*, 1996, RAMOS & SELISTRE-DE-ARAUJO, 2004). A classificação da lebetase como SVMP PIII contudo, é baseada em sua seqüência de nucleotídeos (SIIGUR *et al.*, 1996) sendo que a proteína nativa apresentando esta característica ainda não foi isolada do veneno bruto.

Alguns indícios apontam fortemente para uma estrutura dimérica da BaG. Tal estrutura poderia comprometer sua atividade hemorrágica *in vitro*. O comportamento desta proteína em condições fisiológicas normais poderia ser diferente, uma vez que outras proteases do veneno poderiam agir sobre a BaG, degradando-a e mantendo suas subunidades separadas, influenciando desta forma, em sua atividade hemorrágica. A auto-proteólise também poderia ser passível de ocorrer em condições fisiológicas normais no veneno. Deste modo, comparar esta proteína com as demais proteínas hemorrágicas da classe PIII isoladas até o momento, torna-se uma tarefa difícil pois nenhuma outra proteína com as características da BaG foi descrita até o presente momento.

A BaG foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP com um IC₅₀ de aproximadamente 180nM. Nestes ensaios, a BaG foi tratada com o inibidor de metaloproteases 1,10-fenantrolina, de modo a excluir o efeito de seu domínio catalítico sobre as plaquetas. A BaG assim tratada foi chamada BaG-I, evidenciando a inativação de seu domínio proteolítico. Assim, a atividade inibitória sobre a agregação

plaquetária foi desempenhada por seus domínios desintegrina(-like)/rico em cisteína. Estes resultados sugerem a atuação da BaG sobre a ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ao fibrinogênio das plaquetas. As atividades da BaG sem tratamento com inibidor de metaloproteases e sobre a agregação plaquetária estimulada por colágeno não foram testadas.

A agregação plaquetária possui função chave na hemostasia e ocorre através da ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ da superfície das plaquetas à seqüência RGD do fibrinogênio. Quando o vaso sanguíneo é danificado, as plaquetas aderem à superfície lesada liberando substâncias ativas que as agregam. Tais substâncias ativas são agonistas como trombina, epinefrina, fator de ativação plaquetária ou ADP. A estimulação por agonistas resulta na ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na membrana das plaquetas permitindo a ligação ao fibrinogênio e assim promovendo a agregação plaquetária (HAWIGER *et al.*, 1980; PEERSCHKE *et al.*, 1980).

A maioria das SVMs da classe PIII inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno. Tanto a bothropasina nativa como a produzida de forma recombinante foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno com IC_{50} de 290nM e 1,4 μ M, respectivamente (ASSAKURA *et al.*, 2003). Em experimentos para determinar a atividade da jararagina sobre a agregação plaquetária, tanto a proteína nativa (JAR), como a inativada com 1,10-fenantrolina (I-JAR),

foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno (KAMIGUTI *et al.*, 1996). É importante ressaltar o efeito do domínio metaloprotease neste caso. O IC₅₀ para a JAR foi menor (40nM) quando comparado ao IC₅₀ da I-JAR (140nM), o que comprova a atuação do domínio metaloprotease na atividade inibitória da agregação plaquetária induzida por colágeno. Os autores demonstram que o domínio proteolítico da jararagina é capaz de causar a proteólise da integrina $\alpha_2\beta_1$ presente na superfície das plaquetas. Contudo, o domínio desintegrina-*like* também desempenha um papel importante nesta inibição. A jararagina se ligaria à subunidade α da integrina $\alpha_2\beta_1$ das plaquetas através de seu domínio desintegrina-*like* e em seguida, o domínio metaloprotease seria responsável pela clivagem da subunidade β , inibindo assim a agregação plaquetária (KAMIGUTI *et al.*, 1996). Conforme citado acima, a atividade da BaG na agregação plaquetária induzida por ADP foi independente do domínio metaloprotease, uma vez que o mesmo foi inibido pelo tratamento com 1,10-fenantrolina.

A jararagina-C, o produto da autólise da jararagina, que possui apenas os domínios desintegrina-*like*/rico em cisteína também é uma potente inibidora da agregação plaquetária induzida por colágeno, porém também é capaz de inibir a agregação estimulada por ADP, embora com menor potência (USAMI *et al.*, 1994). A catrocolastatina por sua vez, é uma SVMP PIII hemorrágica presente no veneno de *Crotalus atrox* (ZHOU *et al.*, 1995) que também inibe a agregação plaquetária

induzida por colágeno, mas que não possui efeito na agregação induzida por ADP ou tromboxano A₂ (ZHOU *et al.*, 1996). A catrocolastatina-C também apresenta características semelhantes (SHIMOKAWA *et al.*, 1997). Os domínios desintegrina-*like*/rico em cisteína da atrolisina A produzidos de forma recombinante foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida tanto por colágeno, quanto por ADP (JIA *et al.*, 1997). A basparina A, uma SVMP PIII isolada do veneno de *B. asper* foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e o tratamento com 1,10-fenantrolina não diminuiu sua atividade, comprovando que os domínios desintegrina-*like*/rico em cisteína são os responsáveis por esta atividade (LORIA *et al.*, 2003).

Todos estes resultados demonstram haver diferenças funcionais entre os diferentes domínios das SVMPs de classe PIII no que diz respeito à inibição da agregação plaquetária, sendo que algumas podem interagir somente com a integrina $\alpha_2\beta_1$ e outras podem interagir também com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na superfície das plaquetas.

Várias desintegrinas monoméricas pequenas (entre 5 e 9kDa), derivadas da classe PII das SVMPs e também algumas desintegrinas diméricas foram descritas como potentes inibidoras da agregação plaquetária. A tabela 3 sumariza os resultados obtidos para várias desintegrinas obtidas de diferentes espécies de serpentes, na inibição da agregação plaquetária. Em muitas destas desintegrinas, a

seqüência RGD se liga a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ nas plaquetas, impedindo sua ligação ao fibrinogênio e inibindo assim a agregação plaquetária.

Tabela 3 – Desintegrinas inibidoras da agregação plaquetária

Desintegrina	Massa (kDa)	Espécie*	IC ₅₀	Indutor	Referência
Monoméricas					
Saxatilina	7,7	<i>G. saxatilis</i>	127nM	ADP	HONG <i>et al.</i> , 2002
Salmosina	7,5	<i>A. halys</i>	131nM	ADP	KANG <i>et al.</i> , 1998
Trigramina	9	<i>T. gramineus</i>	130nM	ADP	HUANG <i>et al.</i> , 1987
Crotavirina	9,2	<i>C. viridis</i>	110nM	Colágeno Trombina Tromboxano	LIU <i>et al.</i> , 1995
Jarastatina	6	<i>B. jararaca</i>	2,2μM	ADP	COELHO <i>et al.</i> , 1999
Echistatina	5,4	<i>E. carinatus</i>	3μM 30nM	Colágeno ADP	GAN <i>et al.</i> , 1988
Albolabrina	7,5	<i>T. albolabris</i>	130nM	ADP	BEVIGLIA <i>et al.</i> , 1995
Eristostatina	5,7	<i>E. macmahoni</i>	8nM	ADP	BEVIGLIA <i>et al.</i> , 1995
Diméricas					
CN	13,5**	<i>A. contortrix contortrix</i>	49nM	ADP	TRIKHA <i>et al.</i> , 1994 ^a
EC3	14,7**	<i>E. carinatus suchoreki</i>	1μM	ADP	MARCINKIEWICZ <i>et al.</i> , 1999 ^a
EMF10	14,5**	<i>E. macmahoni</i>	1,6μM	ADP	MARCINKIEWICZ <i>et al.</i> , 1999 ^b
CC5	14,1**	<i>C. cerastes</i>	93nM	ADP	CALVETE <i>et al.</i> , 2002
CC8	14,1**	<i>C. cerastes</i>	11nM	ADP	CALVETE <i>et al.</i> , 2002

**G. saxatilis* = *Gloydus saxatilis*, *A. halys* = *Agkistrodon halys*, *T. gramineus* = *Trimeresurus gramineus*, *C. viridis* = *Crotalus viridis*, *B. jararaca* = *Bothrops jararaca*, *E. carinatus* = *Echis carinatus*, *T. albolabris* = *Trimeresurus albolabris*, *E. macmahoni* = *Eristocophis macmahoni*, *A. contortrix contortrix* = *Agkistrodon contortrix contortrix*, *E. carinatus suchoreki* = *Echis carinatus suchoreki*, *C. cerastes* = *Cerastes cerastes*.

**Massa molecular total da proteína, equivalente a soma das subunidades.

Na tentativa de elucidar as interações entre a BaG e as integrinas da superfície celular, ensaios de adesão celular foram realizados. Nos ensaios de inibição da adesão celular foram utilizadas tanto células tumorais da linhagem K562 de eritroleucemia humana transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (K562 $\alpha_2\beta_1$), como células tumorais K562, que exibem naturalmente em suas membranas grandes quantidades da integrina $\alpha_5\beta_1$ (NATH *et al.*, 1999). A BaG-I foi capaz de inibir a adesão de células K562 à fibronectina, mas não foi capaz de inibir significativamente a adesão de células K562 $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno.

Estes resultados indicam inicialmente que a BaG-I não interage com a integrina $\alpha_2\beta_1$, uma vez que não é capaz de inibir a sua interação com seu ligante natural, o colágeno tipo I. Além disso, os indícios apontam para o fato de que a BaG-I poderia interagir com outras integrinas ligantes de fibronectina uma vez que inibe a adesão das células K562 a esta proteína da ECM. A fibronectina é ligante para várias integrinas, contudo, a presença de grandes quantidades da integrina $\alpha_5\beta_1$ nas células da linhagem K562 (NATH *et al.*, 1999), torna a BaG potencial candidata a interagir com tal integrina. Uma curva dose-resposta foi construída para determinar a concentração da BaG-I que inibia 50% da adesão das células (IC₅₀) K562 à fibronectina. Os resultados indicaram um IC₅₀ de 3,65 μ M para a atividade inibitória da adesão celular da BaG-I em células da linhagem K562.

Os dados da literatura com relação a outras SVMs apontam para valores de IC_{50} mais baixos. A jararagina tratada com 1,10-fenantrolina (I-JAR) inibiu a adesão de células transfectadas com a integrina α_2 com um IC_{50} de 50nM e esta inibição foi antagonizada pela competição de seus domínios desintegrina-*like*/rico em cisteína com o colágeno, uma vez que o IC_{50} para a jararagina não inibida (JAR) não foi muito menor (30nM) comparado com o efeito da I-JAR. A jararagina também inibiu a interação de células ECV304 e HUVEC ao colágeno tipo I com IC_{50} de 52 e 62nM (JAR) e 140 e 125nM (I-JAR) respectivamente (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2001).

Para determinar a seletividade da jararagina na ligação com integrinas presentes na superfície de células transfectadas ou não, os mesmos autores analisaram a competição da ligação por integrinas entre a jararagina e os ligantes imobilizados de tais integrinas, utilizando ensaios de adesão celular. Tanto a I-JAR quanto a JAR foram eficazes na inibição da adesão de células expressando a integrina $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I. Em concentrações maiores estas proteínas inibiram também a adesão de linhagens celulares que expressam outras integrinas, tais como as integrinas $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$ aos seus ligantes naturais. Porém não foram capazes de inibir a adesão de células expressando as integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_4\beta_1$ aos seus ligantes (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2001). Estes resultados confirmam o papel da jararagina como excelente

antagonista da interação da integrina $\alpha_2\beta_1$ com o colágeno, mas mostram também a ligação da jararagina com outras integrinas. A BaG contudo, apresentou um comportamento especificidade de ligação a integrinas diferente pois demonstrou não interagir com a integrina $\alpha_2\beta_1$ mas sim com as integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{11b}\beta_3$ de acordo com os ensaios de adesão celular e inibição da agregação plaquetária.

A alternagina (ALT) (SOUZA *et al.*, 2000) é outra SVMP da classe PIII. Durante seu isolamento do veneno bruto de *B. alternatus*, esta proteína sofre auto-proteólise, perdendo o domínio metaloprotease e permanecendo somente com os domínios localizados C-terminalmente ao domínio catalítico, sendo então chamada alternagina-C (ALT-C). Tanto a ALT quanto a ALT-C são capazes de inibir a adesão de células transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno com IC_{50} de 134 e 100nM, respectivamente. Contudo, nem mesmo concentrações altas ($> 5\mu M$) de ALT e ALT-C foram capazes de inibir a interação das integrinas $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$ com seus respectivos ligantes, fibrinogênio, colágeno IV, fibronectina e VCAM-1 (SOUZA *et al.*, 2000).

O valor de IC_{50} ($3,65\mu M$) encontrado para a BaG-I na inibição da adesão das células K562 à fibronectina é alto se comparado com os valores citados acima, para outras SVMPs. Contudo, é importante salientar que a BaG é uma molécula de grande massa que possui o domínio metaloprotease, que embora inibido, faz parte de sua estrutura e

pode aumentar desta forma o valor de IC_{50} nos ensaios de adesão celular. Este valor seria provavelmente menor se a BaG fosse testada na ausência do domínio metaloprotease.

Para avaliar a capacidade da BaG-I como molécula adesiva, a mesma foi testada em ensaios de promoção de adesão. A BaG-I foi capaz de promover a adesão de células K562 mas não promoveu a adesão de células K562 $\alpha_2\beta_1$. Estes resultados indicam mais uma vez a capacidade de interação da BaG-I com a integrina $\alpha_5\beta_1$ presente na superfície das células K562, em detrimento da integrina $\alpha_2\beta_1$.

A ALT e a ALT-C também foram testadas em ensaios de promoção de adesão. Ao contrário da BaG, tanto a ALT quanto a ALT-C foram capazes de promover a adesão de células K562 $\alpha_2\beta_1$, mas não foram capazes de promover a adesão de células K562 (SOUZA *et al.*, 2000).

Desintegrinas pequenas também podem funcionar como moléculas de adesão. A albolabrina é capaz de promover a adesão de células B16F10 de maneira dose-dependente provavelmente através da ligação de sua seqüência adesiva RGD com as integrinas da superfície celular (SOSZKA *et al.*, 1991). Da mesma forma, as desintegrinas diméricas também são capazes de promover a adesão celular. A CN imobilizada é capaz de promover a adesão de células de melanoma

humano M24 e esta adesão é inibida pela incubação prévia das células com anticorpos monoclonais anti- β_1 e anti- $\alpha_5\beta_1$ (TRIKHA *et al.*, 1994b).

Com o objetivo de elucidar a especificidade de interação da BaG-I com integrinas, ensaios de competição com anticorpos foram realizados. Nestes ensaios, a BaG-I foi imobilizada nos poços de uma placa de 96 poços e as células testadas foram previamente incubadas com anticorpos anti- $\alpha_5\beta_1$, anti- β_1 , anti- α_v e anti- β_3 . Somente a adesão das células previamente incubadas com os anticorpos anti- $\alpha_5\beta_1$ e anti- β_1 foi inibida, sugerindo fortemente a ligação da BaG-I com a integrina $\alpha_5\beta_1$. Contudo, a quantidade de integrinas $\alpha_v\beta_3$ nas membranas das células K562 é um dado inexistente na literatura pesquisada para o desenvolvimento desta tese. Como a presença da integrina $\alpha_5\beta_1$ é marcante nesta linhagem, é coerente postular que os anticorpos anti- $\alpha_v\beta_3$ estariam bloqueando apenas uma pequena parte destes receptores, o que poderia mascarar os resultados obtidos, de forma que as integrinas $\alpha_5\beta_1$ poderiam estar participando de maneira quase que exclusiva na ligação das células K562 à BaG-I imobilizada. Em ensaios com células ricas em integrinas $\alpha_v\beta_3$, o bloqueio destes receptores com os anticorpos anti- $\alpha_v\beta_3$ poderia ser mais efetivo e – havendo especificidade de ligação – resultar na perda da capacidade de ligação de tais células à BaG. Portanto, com os dados obtidos neste experimento, a ligação da BaG com a integrina $\alpha_v\beta_3$ não pode ainda ser completamente descartada.

A BaG-I também foi testada em ensaios de desadesão. Para tal, as células K562 foram deixadas aderir sobre a fibronectina e a BaG-I (4 μ M) foi então adicionada aos poços. Verificou-se que a BaG-I foi capaz de desaderir as células previamente ligadas à fibronectina, o que novamente evidencia que a ligação da BaG-I com as células K562 ocorre através da integrina $\alpha_5\beta_1$, uma vez que a fibronectina é ligante desta integrina. A BaG-I portanto, compete com a fibronectina pela ligação com a integrina $\alpha_5\beta_1$. De posse de todos estes resultados é coerente postular que a especificidade de ligação da BaG está relacionada a integrina $\alpha_5\beta_1$, além da integrina $\alpha_{11b}\beta_3$. A integrina $\alpha_2\beta_1$ parece não interagir com a BaG, contudo há ainda a possibilidade de que as subunidades isoladas tenham a capacidade de se ligar com tais integrinas. A BaG, embora aparentemente possua subunidades de massas moleculares idênticas, pode possuir seqüências distintas de aminoácidos, inclusive nos sítios adesivos de seu domínio desintegrina. Desta forma, a presença de outra seqüência adesiva, além da RGD, deve ser considerada. A função de tal seqüência poderia estar sendo influenciada pela ação de resíduos adjacentes de modo que a seqüência RGD presente na outra subunidade estaria agindo preferencialmente e desempenhando as funções biológicas descritas para a BaG.

Estudos de inibição da proliferação celular pela BaG-I também foram realizados. A BaG-I imobilizada é capaz de diminuir o

número de células K562 viáveis em uma maneira dose e tempo dependente. Apesar da BaG-I ser capaz de promover a adesão desta linhagem celular, pode-se supor que esta proteína não forneça sinais de sobrevivência suficientes capazes de manter a viabilidade celular por longos períodos (24 a 72h).

Muitas desintegrinas já descritas são capazes de inibir a proliferação de várias linhagens celulares normais ou tumorais através da interação com as integrinas da membrana celular. A salmosina inibe a proliferação de células de melanoma da linhagem B16F10 sobre o colágeno de maneira dose-dependente e com IC_{50} de $2,7\mu M$. A inibição da proliferação celular desencadeada pela salmosina ocorre muito provavelmente devido a sua interação com as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e/ou β_1 (KANG *et al.*, 2000). A salmosina é também capaz de inibir a proliferação de células BCE induzida por FGF (*Fibroblast growth factor*) (KANG *et al.*, 1999), o que ocorre devido à indução da desadesão destas células da ECM. O tratamento com salmosina por 12h induz a desadesão de aproximadamente 70% das células BCE. Além disso, a salmosina induz mudanças morfológicas extremas nas células BCE. Na presença da salmosina, as moléculas de actina cortical se desorganizam completamente após 150min de incubação resultando na morfologia circular das células e na diminuição nos níveis de expressão da actina. Estes resultados indicam que a salmosina é capaz de desorganizar as fibras corticais de actina nas adesões focais e diminuir seus níveis de

expressão. Após 12 horas de incubação das células BCE com a salmosina a expressão da FAK fosforilada, da p130^{cas} e da paxilina diminui sensivelmente, o que evidencia a capacidade da salmosina em inativar as vias de sinalização dependentes de FAK (KANG *et al.*, 2000).

A ligação das integrinas com as proteínas da ECM leva a sua ativação e a fosforilação da FAK (*Focal adhesion kinase*). A FAK por sua vez é firmemente acoplada as adesões focais através do recrutamento de proteínas do citoesqueleto como talina, vinculina e paxilina pela sua ligação ao domínio citoplasmático das integrinas (LEWIS & SCHWARTZ, 1995; YAMADA & MIYAMOTO, 1995; CRAIG & JOHNSON, 1996). A FAK fosforilada se liga a proteínas como Src e Fyn (SCHALLER & PARSONS, 1994) que por sua vez fosforilam outras proteínas associadas a FAK como paxilina, tensina e p130^{cas} (VUORI *et al.*, 1996). A fosforilação destas proteínas presentes nas adesões focais pode estar envolvida na regulação da formação destas adesões e na regulação da proliferação celular através das vias de sinalização da MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), ERK (*Extracellular signaling regulated kinase*) e JNK (*Jun N-terminal kinase*) (VUORI *et al.*, 1996; SCHLAEPFER *et al.*, 1997). A ILK (*Integrin-linked kinase*) se liga diretamente ao domínio citoplasmático das subunidades β_1 e β_3 das integrinas e fosforila a PKB/Akt (*Protein kinase B*). A ILK também fosforila e inibe a GSK-3 (*Glycogen synthase kinase 3*) o que por sua vez ativa a β -catenina (HANNIGAN *et al.*, 1996; NOVAK, 1998). A ativação da

PKB/Akt e a inibição da GSK-3 pela ILK leva a supressão da apoptose e a promoção da sobrevivência celular (MARC *et al.*, 1998). Os experimentos com a salmosina relacionados a modificações na expressão de ILK, PI-3K e β -catenina indicam que esta desintegrina não afeta as vias de sinalização dependentes de ILK. Em resumo, a salmosina compete com as proteínas da ECM pela ligação a integrina $\alpha_v\beta_3$. A salmosina ligada à superfície celular desorganiza as adesões focais e acelera a desadesão das células da ECM. Um sinal de que a célula perdeu sua ancoragem à ECM é então transmitido intracelularmente e inativa a via de sinalização dependente de FAK, o que inibe a proliferação celular e leva à apoptose (KANG *et al.*, 2000).

O efeito apoptótico nas células tratadas com a BaG-I não foi estudado, contudo como esta proteína é também capaz de promover a desadesão celular, é coerente postular que esta molécula poderia possuir efeitos semelhantes aos observados para a salmosina. Entretanto, os ensaios de proliferação celular realizados com a BaG-I, foram diferentes dos realizados com a salmosina, uma vez que a primeira foi imobilizada no plástico e as células foram semeadas sobre ela. Este procedimento é viável pois a BaG-I é capaz de promover a adesão das células da linhagem K562 utilizadas no experimento. O mecanismo pelo qual o número de células K562 viáveis semeadas sobre a BaG-I diminui ao final do tempo experimental permanece obscuro, mas provavelmente ocorre ou pelo aumento da apoptose, ou pela diminuição da capacidade proliferativa

das células durante as etapas do ciclo celular. Em resumo, após a ligação do domínio desintegrina da BaG-I com a integrina $\alpha_5\beta_1$ da superfície das células da linhagem K562, vias de sinalização apoptóticas ou relacionadas ao ciclo celular seriam ativadas resultando no efeito de diminuição de células viáveis observado no experimento.

Os resultados observados nos ensaios com a BaG a tornam uma molécula bastante intrigante e ao mesmo tempo muito interessante, uma vez que o esperado para uma SVMP PIII seria a presença de uma seqüência adesiva diferente da RGD, pois estas proteínas são normalmente derivadas da classe PII das SVMPs. Porém fortes indícios (reação com anticorpos anti-RGD, inibição da agregação plaquetária induzida por ADP, ligação específica com a integrina $\alpha_5\beta_1$, baixa afinidade de ligação com a integrina $\alpha_2\beta_1$) apontam para a presença desta seqüência na estrutura da BaG. Contudo, o estudo das subunidades isoladas da BaG pode fornecer resultados diferentes dos obtidos com a BaG na forma dimerizada. A presença de resíduos adjacentes às seqüências adesivas de suas subunidades também é importante para a especificidade de ligação das desintegrinas, além da própria estrutura tridimensional, do número de pontes dissulfeto e da estrutura do *loop* RGD. Todas estas características estruturais são capazes de interferir na capacidade de ligação das desintegrinas aos seus ligantes específicos (SCARBOROUGH *et al.*, 1993; LU *et al.*, 1994; PFAFF *et al.*, 1994, McLANE *et al.*, 1996; YAMADA *et al.*, 1996). Portanto, somente com o

seqüenciamento total da BaG as respostas para estas questões poderão ser elucidadas. A clonagem da BaG faz parte de outro projeto desenvolvido em nosso laboratório e está atualmente em andamento.

A estrutura dimérica única da BaG dificulta as comparações com outras SVMPs de classe PIII com estrutura monomérica e até mesmo com as desintegrinas diméricas já isoladas, uma vez que estas não apresentam outros domínios como metaloprotease e rico em cisteína. Contudo, sabe-se que a estrutura dimérica pode conferir propriedades interessantes às desintegrinas. A estrutura dimérica da CN proporciona a esta proteína uma capacidade de induzir a fosforilação da tirosina após a ligação com plaquetas (CLARK *et al.*, 1994), enquanto que desintegrinas monoméricas como a eristostatina não são capazes de ativar eventos de sinalização *outside-in* (DANEN *et al.*, 1998). Ainda, a CN afeta os níveis de proteínas fosforiladas em células tumorais e é capaz de fosforilar a FAK e p130^{cas} em células tumorais (RITTER *et al.*, 2000), comprovando que as desintegrinas diméricas podem agir não somente como ligantes passivos das integrinas, mas também iniciar eventos de sinalização importantes que podem interferir com a sobrevivência e migração de células tumorais. A estrutura dimérica proporciona tal efeito, pois é capaz de aproximar as integrinas da superfície celular, iniciando o efeito de *clustering* de integrinas, conforme descrito na introdução deste trabalho. Ou seja, a ligação de cada subunidade da CN através de seus domínios desintegrina a uma integrina na membrana aproxima as duas integrinas

ligadas e permite a ativação de cascatas de sinalização. As desintegrinas com apenas uma subunidade não teriam tal capacidade. A estrutura dimérica de algumas desintegrinas proporciona portanto, mais uma ferramenta importante no estudo da interação com as integrinas celulares e conseqüentemente no estudo das funções destas integrinas nos vários processos biológicos em que estão envolvidas. A presença de características únicas dentre as SVMP de classe PIII torna a BaG uma molécula muito interessante e um instrumento bastante útil no estudo de vários processos biológicos, tanto em condições normais, quanto em condições patológicas.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Os experimentos relacionados aos efeitos da alternagina-C (ALT-C) sobre a expressão gênica de fibroblastos humanos foram realizados no laboratório do Dr. Jay W. Fox, para o desenvolvimento do projeto elaborado para a realização do estágio no exterior.

A utilização desta proteína nos ensaios foi adotada pois a ALT-C é uma proteína já bem caracterizada em nosso laboratório. Este capítulo apresenta especificamente os resultados obtidos com relação às diferenças na expressão gênica em fibroblastos humanos incubados sobre a ALT-C em comparação com a expressão gênica de fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I ou sobre o plástico. A ALT-C é uma proteína presente no veneno de *Bothrops alternatus* que possui os domínios desintegrina-like (ECD) e rico em cisteína e é gerada a partir da liberação proteolítica do domínio metaloprotease. A ALT-C é uma desintegrina com massa molecular de aproximadamente 30kDa e a forma anterior ao processamento, denominada alternagina (ALT), possui uma massa molecular de aproximadamente 66kDa. A seguir serão apresentados a metodologia, os resultados e as discussões referentes a estes experimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

A resina de filtração em gel Superdex 200 foi obtida da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Fibroblastos humanos (Clonetics, San Diego, CA, USA) foram gentilmente fornecidos pelo prof. Dr. Jay W. Fox (University of Virginia Health System, Charlottesville, VA, USA). Soro fetal bovino (FBS) e os antibióticos penicilina e estreptomicina foram obtidos da Cultilab (Campinas, SP). O antifúngico anfotericina B foi obtido da Gibco (Carlsbad, CA, USA). CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) foi obtida da Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Os *Gene Chips*TM foram adquiridos pelo Dr. Jay W. Fox, da Affymetrix (Santa Clara, CA, USA). Todos os demais reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico. Os *primers* para β -actina foram gentilmente cedidos pela Dra. Ana Maria Moura-da-Silva (Instituto Butantan, São Paulo, SP).

MÉTODOS

Obtenção da Alternagina-C

A alternagina-C (ALT-C) foi obtida através do fracionamento do veneno bruto da serpente *Bothrops alternatus* em coluna de filtração em gel Superdex 200, segundo o protocolo descrito por SOUZA *et al.* (2000). Brevemente, 50mg do veneno bruto foram dissolvidos em 1ml de

tampão Tris-HCl 10mM adicionado de NaCl 100mM, pH 8,6. A amostra de veneno foi centrifugada (centrífuga Eppendorf 5804R) a 13.000 x g e temperatura de 4°C para a eliminação do material insolúvel e em seguida aplicada à coluna Superdex 200 (80cm x 1,6cm) em um fluxo de 0,5ml/min. As amostras foram eluídas com o mesmo tampão citado acima e o primeiro pico de absorbância em comprimento de onda de 280nm foi coletado e concentrado para um volume final de 1ml em sistema de concentração Centriprep (Millipore) através de centrifugação a 4.500 x g em temperatura de 4°C. Esta amostra foi novamente aplicada à mesma coluna (Superdex 200) e as amostras representando o segundo pico de absorbância (280nm), contendo a ALT-C, foram novamente concentradas em sistema Centriprep para um volume final de 1ml. Todos os passos cromatográficos para obtenção da ALT-C foram realizados a 4°C.

Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteína das amostras foi realizada de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976), utilizando o *kit* BioRad para determinação de concentração protéica (BioRad *protein assay*).

Manutenção das linhagens celulares

Os fibroblastos humanos foram mantidos em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media* – Gibco), contendo 10% de FBS, L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml) e anfotericina B (250UG/ml) (Gibco) a 37°C com 5% de CO₂ em estufa de cultura celular (*Cellstar*). As células utilizadas nos experimentos estavam entre as passagens 4 e 12.

Tratamento das células para ensaios de *microarrays* através de *GeneChips*TM

Alternagina-C (10µg/ml) ou colágeno bovino tipo I (Chronolog) (40µg/ml) foram adicionados ao fundo de placas de Petri (Corning) (10cm de diâmetro) tratadas para cultura celular. Em seguida as placas foram incubadas *overnight* a 4°C, com o objetivo de promover o *coating* das mesmas com a ALT-C e colágeno tipo I. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram incubadas por 2h a temperatura ambiente com uma solução de BSA 1% em tampão PBS (NaCl 140mM, KCl 2,5mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,4mM, pH 7,4) com o objetivo de promover o bloqueio dos pontos em que a ALT-C ou o colágeno não aderiram ao fundo da placa. As monocamadas confluentes de fibroblastos humanos na passagem 4 (P4) foram tratadas com solução de tripsina/EDTA (tripsina 0,1%, EDTA 1mM, NaCl 150mM, KCl 2mM, Na₂HPO₄ 8mM,

KH₂PO₄ 1,4mM, pH 7,2) e em seguida coletados por centrifugação e ressuspendidos em meio DMEM. A viabilidade celular foi determinada através do corante *Trypan Blue* (Gibco). Em seguida, os fibroblastos humanos em uma concentração de 80% da confluência máxima (aproximadamente 2×10^6 células/ml) foram adicionados às placas e incubados por 2h a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Como controle, a mesma quantidade de fibroblastos humanos foi adicionada diretamente sobre o plástico. Após o tempo de incubação as placas foram retiradas da estufa e o meio de cultura foi aspirado. As células foram lavadas uma vez com tampão PBS e em seguida, foi adicionado de tampão de lise celular (Qiagen RNEasy *kit*). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Isolamento do RNA total

O RNA total das células tratadas ou não com ALT-C foi realizado utilizando o *kit* RNEasy da Qiagen. Às células crescendo sobre as placas de Petri, foi adicionado 700µl de tampão de lise. Em seguida, a placa foi incubada por 5min a temperatura ambiente e as células lisadas foram aspiradas e mantidas a -80°C até o isolamento do RNA total, com os acessórios e reagentes do *kit*.

Preparação da seqüência alvo e hibridização dos *Gene Chips*TM

Um primer poli-T contendo a enzima promotora RNA polimerase T7 e 20µg de cada amostra de RNA total correspondente a cada tratamento foram utilizados para produzir um cDNA dupla fita. Uma reação de transcrição *in vitro* produzida com o *kit Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labeling* foi utilizada para produzir cRNA amplificado e marcado com biotina. A integridade e a distribuição de tamanho das subunidades do RNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose (Agilent Bioanalyzer). Dez microgramas de cRNA marcado foi utilizado para a hibridização com os *GeneChips*TM (Affymetrix HU_95A) contendo conjuntos de sondas que representam aproximadamente 10.000 genes presentes no genoma humano. A hibridização foi realizada durante 16h e em seguida os *GeneChips*TM foram escaneados em um *scanner* (Affymetrix *GeneArray Scanner*) e analisados quanto à imagem fornecida.

Análise dos dados

As imagens escaneadas foram primeiramente examinadas para a verificação de defeitos visíveis e em seguida analisadas com relação ao seu alinhamento. Análises posteriores foram realizadas utilizando uma combinação de programas incluindo *Affymetrix Microarray Analysis* Suíte 5.0 (MAS 5.0, Affymetrix, Santa Clara, CA) e Dchip (LI & WONG, 2001; SCHADT *et al.*, 2001). A detecção de um gene particular,

chamado ausente, presente ou marginal, foi realizada utilizando o programa MAS 5.0 e esta detecção foi em seguida utilizada no programa Dchip. A quantificação dos genes foi obtida usando o programa Dchip, o qual utiliza uma metodologia baseada em modelos para derivar o índice de sensibilidade da sonda e o índice de expressão, para cada transcrito. Os dois índices foram combinados para quantificar um gene particular. A normalização dos *arrays* foi realizada utilizando um conjunto invariante de metodologias. A análise comparativa das amostras envolveu o uso de *fold changes* e testes estatísticos que caracterizaram estes *fold changes*. Em geral, foi considerado um p menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$) e um *fold change* maior ou igual a 1,5 ($fold\ change \geq 1,5$) em uma combinação de porcentagem de genes presentes maior ou igual a 50 (% Presente ≥ 50) como uma indicação da mudança significativa da expressão gênica tanto para *up-regulation* ou *down-regulation*. Genes *housekeeping* tais como GAPDH ou β -actina foram examinados como uma medida do controle da qualidade. Os gráficos relacionados aos processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares dos genes que tiveram sua expressão alterada foram elaborados com a ferramenta *NetAffx Gene Ontology Analysis Tool* na página da Affymetrix (*NetAffx Analysis Center*) (<http://www.affymetrix.com>) de acordo com sua ontologia gênica (GO) (<http://geneontology.com>).

Ensaio de expressão de VEGF através de RT-PCR

Fibroblastos humanos (2×10^6 células/ml) em meio DMEM contendo 10% de FBS, previamente incubados ou não por 30min com ALT-C solúvel (400nM) foram adicionados em placas de Petri (Corning) (10cm de diâmetro) tratadas para cultura celular previamente cobertas com ALT-C (10 μ g/ml) ou colágeno tipo I bovino (40 μ g/ml), ou diretamente sobre o plástico. As placas foram mantidas *overnight* a 4°C e em seguida, fibroblastos humanos (passagens 6 a 12) foram adicionados e as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ durante 4, 24 ou 48h. A viabilidade celular foi determinada através do corante *Trypan Blue* (Gibco). Após o término de cada período de incubação, o meio de cultura (meio condicionado) de cada placa foi aspirado e mantido a -80°C e as células foram lisadas com o reagente Trizol (Invitrogen) ou com tampão de lise celular contendo 50mM Tris-HCl, pH 7,4 adicionado de 150mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 1,5mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% Glicerol, 1mM PMSF, 1mg/ml de leupeptina e 1mg/ml de pepstatina. Células semeadas diretamente sobre plástico foram utilizadas como controles nestes experimentos. O RNA total das células foi isolado com o reagente Trizol (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante e em seguida, o mesmo foi tratado com DNase (Promega) para eliminar qualquer DNA contaminante. Os experimentos de RT-PCR foram realizados utilizando o *kit One Step RT-PCR* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os seguintes *primers* para VEGF humano (isoforma165) foram

utilizados: *forward* GAGCGGAGAAAGCATTGTTT; *reverse* TGCAACGCGAGTCTGTGTTT (número de acesso no GenBank: BC058855 gi 37589047). *Primers* para β -actina foram utilizados nas mesmas condições como controles endógenos (*forward*, CGTGGGCCCGCCCTAGGCACCAGGG, e *reverse*, CGGAGGAAGAGGATGCGGCAGTGG). Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 2%.

Ensaio de expressão de VEGF através de ELISA

Para os ensaios de ELISA utilizou-se o *kit Quantikine immunoassay for human VEGF* (R&D Systems), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, 200 μ l do meio condicionado ou do extrato celular de cada condição testada, além dos controles, foram adicionados em cada poço da placa, previamente coberto com um anticorpo monoclonal anti-VEGF humano. Após 2h de incubação em temperatura ambiente, os poços foram lavados e um anticorpo policlonal anti-VEGF humano ligado a uma enzima foi adicionado a cada poço. Após outra lavagem, uma solução contendo o substrato para a enzima conjugada com o anticorpo policlonal foi adicionado aos poços e o desenvolvimento da cor ocorreu em proporção à quantidade de VEGF presente no poço. A absorbância foi registrada em um leitor de placa (Dyner) com filtro de 450nm.

Análises estatísticas

Todos os ensaios foram analisados quanto a sua significância estatística. Cada experimento foi repetido no mínimo em duas vezes em triplicata e a média e o erro padrão da média para cada experimento foi determinado. Para a comparação de diferentes concentrações das amostras testadas contra um grupo controle, o teste estatístico de Dunnett foi utilizado. Os níveis aceitáveis de p foram *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

RESULTADOS

Efeitos da alternagina-C (ALT-C) na expressão gênica de fibroblastos humanos

A ALT-C foi utilizada em experimentos de *microarrays* através de *GeneChips*TM. Para observar seu efeito sobre a expressão gênica de fibroblastos humanos, a ALT-C foi imobilizada em placas de Petri e em seguida, as células foram semeadas e incubadas. Após o tempo de incubação, as células foram lisadas e o RNA total foi isolado e a partir dele, foi produzido um cDNA complementar dupla fita. Após este passo, o cDNA foi transformado em cRNA marcado com biotina e em seguida hibridizado com os *GeneChips*TM. O resultado da hibridização indica os genes *up* ou *down* regulados, após o tratamento das células com a ALT-C imobilizada, em comparação com o tratamento das células incubadas sobre colágeno tipo I imobilizado ou diretamente sobre plástico. Os resultados obtidos nestes experimentos estão representados nas figuras 16, 17, 18 e 19 e tabela 4. A ALT-C foi capaz de promover a adesão dos fibroblastos humanos e uma vez aderidos a ela, tais células apresentaram um perfil diferente de expressão gênica, quando comparado ao perfil de expressão de células crescendo sobre colágeno tipo I. Neste experimento 8 genes foram significativamente *up* regulados e 4 genes foram *down* regulados (figura 16 e tabela 4).

A ontologia gênica (GO) (ASHBURNER *et al.* 2000) é uma ferramenta de classificação para genes de acordo com três principais ramos: processo biológico, função molecular e componente celular, sendo amplamente aceita como padrão para o vocabulário relacionado à descrição de genes entre estes ramos. Além de fornecer dados específicos de cada gene pesquisado, a ferramenta disponibilizada na página da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/>) permite a construção de gráficos hierárquicos interativos de acordo com a participação de cada gene com expressão alterada, nos três ramos citados acima. Desta forma, foi possível analisar cada gene que apresentou sua expressão modificada após o tratamento com a ALT-C, de acordo com esta classificação.

De acordo com o gráfico dos processos biológicos, construído a partir dos genes *up* ou *down* regulados em fibroblastos humanos semeados sobre ALT-C, comparado com fibroblastos semeados sobre colágeno tipo I, três genes que codificam produtos protéicos que participam de processos fisiológicos (proteína relacionado ao autismo, nucleoporina e protease ubiquitina específica) e um produto gênico que participa de processos celulares (MCH classe I) foram *up* regulados (figura 17, tabela 4). Com relação à função molecular, genes que codificam proteínas com atividades de transportadoras e com atividade catalítica ou de ligação também tiveram a expressão modificada comparando-se os dois sistemas (figura 18, tabela 4). Por fim, foram identificadas as regiões aonde as proteínas codificadas por tais genes

estariam agindo. Três dos genes alterados codificam proteínas que agem na célula (membrana ou intracelular) e nenhum gene codifica proteínas que agem extracelularmente (figura 19).

Quando comparado com células crescendo diretamente sobre plástico, o perfil de expressão gênica dos fibroblastos se apresentou bastante diferente daquele aonde se compara ALT-C e colágeno tipo I, tanto em relação ao número quanto em relação ao tipo de genes alterados (figura 20, tabelas 5a e 5b). De um total de 75 genes estatisticamente *up* ou *down* regulados, 42 codificam proteínas que participam de processos fisiológicos, 31 codificam proteínas relacionadas a processos celulares e 13 codificam proteínas que participam de processos de desenvolvimento (figura 21, tabelas 5a e 5b). Destes mesmos 75 genes significativamente alterados, 39 codificam proteínas com função de ligação, 25 proteínas com atividade catalítica e 11 proteínas que agem como moléculas de transdução de sinais (figura 22, tabelas 5a e 5b). Com relação à localização, 38 genes codificam para proteínas celulares e 8 para proteínas localizadas extracelularmente (figura 23).

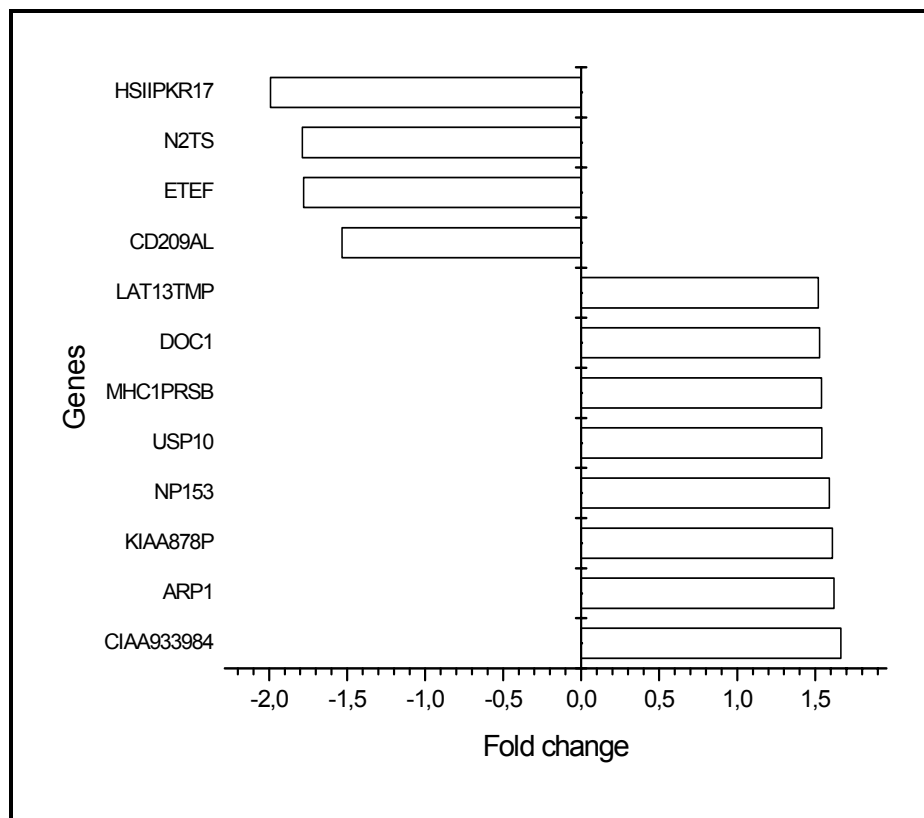


Figura 16 – Diferenças no perfil de expressão gênica em fibroblastos humanos semeados sobre ALT-C comparado com fibroblastos semeados sobre colágeno tipo I. Fibroblastos humanos foram semeados sobre placas cobertas com ALT-C ou colágeno tipo I por 2h. Os fibroblastos foram então lisados e o RNA total foi extraído e cRNA marcado foi sintetizado. Em seguida, o cRNA marcado foi hibridizado nos *GeneChips*TM os quais foram em seguida escaneados com o Affymetrix *Gene Array Scanner*. Genes *up* ou *down* regulados em níveis estatísticos significativos ($p < 0,05$) foram considerados como tendo um *fold change* de 1,5 ou maior, comparado com as células controle. HSIIPKR17 = Protein kinase interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein-kinase gene; N2TS = Neurofibromatosis 2 tumor suppressor; ETEF = Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1; CD209AL = CD 209 antigen-like; LAT13TMP = LAT1-3TM protein; DOC1 = Downregulated in ovarian cancer 1; MHC1PRSB = MHC class I polypeptide-related sequence B; USP10 = Ubiquitin specific protease 10; NP153 = Nucleoporin 153kDa; KIAA878P = Rho-related BTB domain containing 3; ARP1 = Autism-related protein 1; CIAA933984 = Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564B222 (from clone DKFZp564B222), mRNA sequence. Neste experimento, um total de 12 genes foi alterado, sendo 8 *up* regulados e 4 genes *down* regulados.



Figura 17 – Gráfico dos processos biológicos, gerado a partir dos genes *up* e *down* regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I. A cor de cada quadrado do gráfico é baseada no número de genes pertencentes a cada categoria. A cor vermelha representa a categoria com o maior número de genes e a cor azul indica a categoria com o menor número de genes. O número entre parênteses indica a quantidade de genes com expressão alterada, dentro de cada processo biológico. Os números abaixo indicam a porcentagem de genes alterados dentro de cada categoria e o número total de genes representado no *Gene Chip* para a categoria. O gráfico foi construído através da página da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

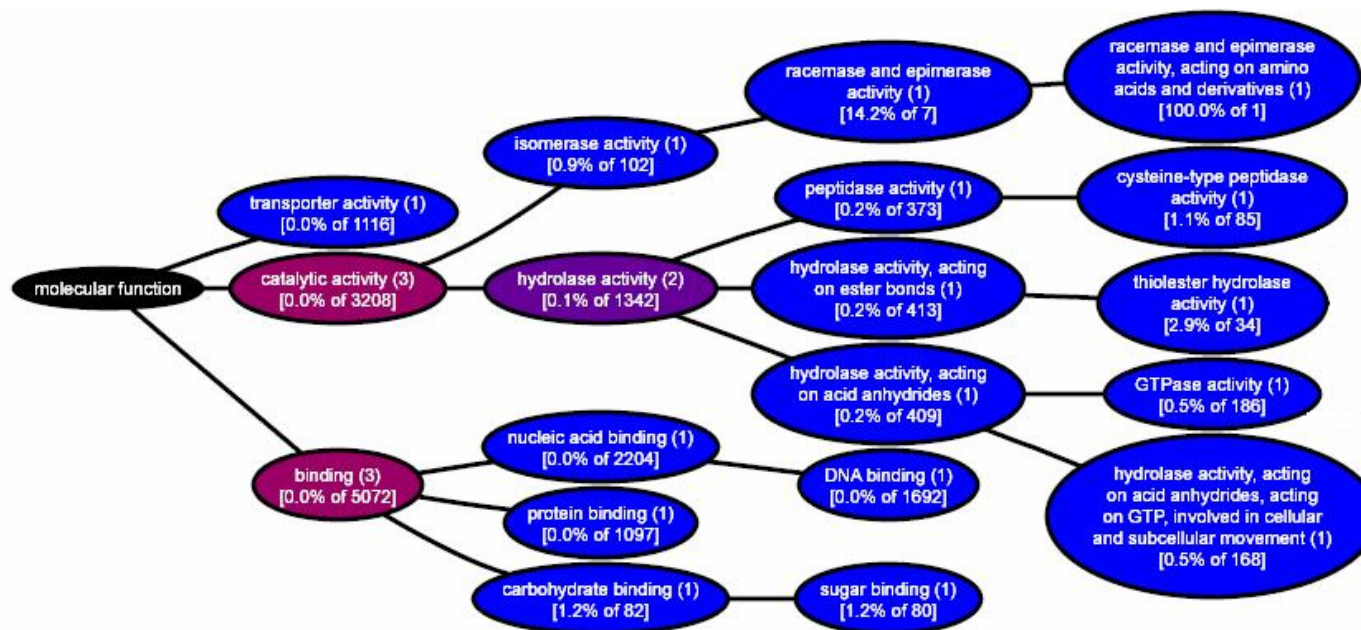


Figura 18 – Gráfico das funções moleculares, gerado a partir dos genes *up* e *down* regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I. A cor de cada elipse do gráfico é baseada no número de genes pertencentes a cada categoria. A cor vermelha representa a categoria com o maior número de genes, a cor azul indica a categoria com o menor número de genes e a cor roxa representa a categoria intermediária. O número entre parênteses indica a quantidade de genes com expressão alterada, dentro de cada função molecular. Os números abaixo indicam a porcentagem de genes alterados dentro de cada categoria e o número total de genes representado no *Gene Chip* para a categoria. O gráfico foi construído através da página da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

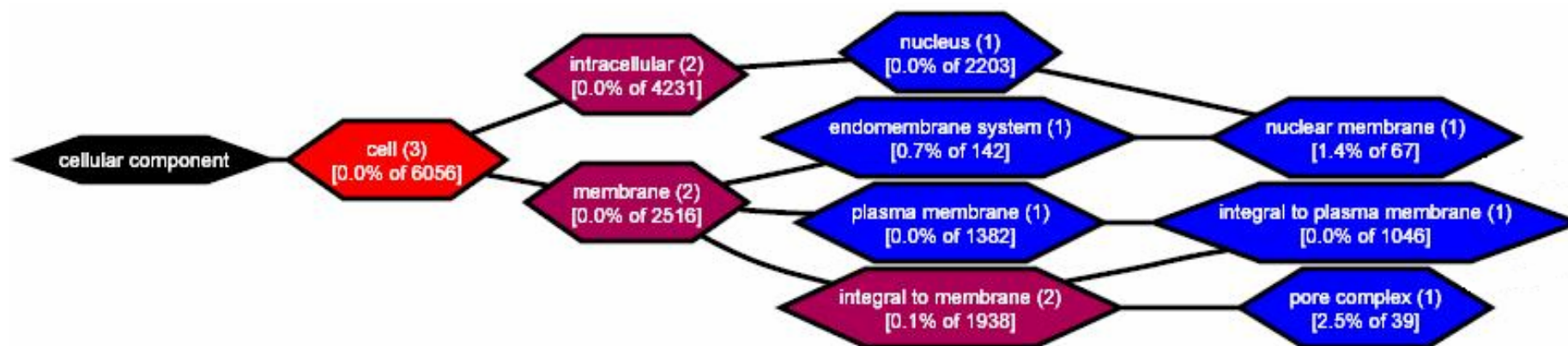


Figura 19 – Gráfico dos componentes celulares, gerado a partir dos genes *up* e *down* regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I. A cor de cada hexágono do gráfico é baseada no número de genes pertencentes a cada categoria. A cor vermelha representa a categoria com o maior número de genes, a cor azul indica a categoria com o menor número de genes e a cor roxa representa a categoria intermediária. O número entre parênteses indica a quantidade de genes com expressão alterada, dentro de cada componente celular. Os números abaixo indicam a porcentagem de genes alterados dentro de cada categoria e o número total de genes representado no *Gene Chip* para a categoria. O gráfico foi construído através da página da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

Tabela 4 – Diferenças no perfil de expressão gênica entre fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C e fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I. Para a elaboração da tabela foram escolhidas apenas as classes ontológicas de processos biológicos e função molecular.

GENE	fold change	Processos Biológicos		Função Molecular			
		Processos Fisiológicos	Processos celulares	Transportador	Ligante/Carreador	Atividade Catalítica	Molécula Adesão
Cluster Incl. AA933984	1,664428						
autism-related protein 1	1,619241	**					
KIAA0878 protein	1,609203						
nucleoporin 153kD	1,589511	**		**	**		
ubiquitin specific protease 10	1,541609	**				**	
MHC class I	1,540583		**		**		
downregulated in ovarian cancer	1,527208						
LAT1-3TM protein	1,520643						
CD209 antigen-like	-1,532696				**		**
eukaryotic translation elongation	-1,77923						
Neurofibromatosis 2	-1,786399						
protein kinase	-1,991689					**	

Neste modelo experimental, vários genes relacionados à proliferação e sinalização celular tiveram sua expressão aumentada (figura 20, tabelas 5a e 5b). Dentre estes genes estão o *Early growth response 2* (EGR2), o qual foi o gene mais *up* regulado neste experimento. Outros genes também relacionados a processos de proliferação e sinalização celular também tiveram sua expressão aumentada após as células serem semeadas sobre ALT-C, comparado com células semeadas sobre o plástico, dentre eles o *Early growth*

response 3 (EGR3), a interleucina 11 (IL11), o *Transforming growth factor* β (TGF- β) e o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).

Estes resultados evidenciaram, portanto, que o perfil de expressão gênica de fibroblastos semeados sobre plástico é diferente daquele onde os fibroblastos são semeados sobre ALT-C e que muitos genes relacionados à proliferação e à sinalização celular (figura 21) tiveram sua expressão alterada nas células incubadas sobre ALT-C imobilizada. As figuras 22 e 23 apresentam a ontologia dos genes quanto a sua função molecular e componente celular, respectivamente. Experimentos de tratamento com os fibroblastos com ALT-C solúvel também foram realizados, porém os resultados evidenciaram problemas na qualidade das hibridizações e não puderam ser finalizados.

Efeitos da alternagina-C (ALT-C) na expressão de VEGF em fibroblastos humanos

Os resultados obtidos com relação à indução da expressão de genes relacionados a processos de sinalização e proliferação celular pela ALT-C imobilizada despertaram o interesse em estudar seu efeito específico. De início, foi escolhido analisar o efeito da ALT-C na expressão de VEGF, uma vez que este gene apresentou-se *up* regulado em fibroblastos semeados sobre ALT-C (tabela 5a, linhas sombreadas em amarelo). O VEGF é uma citocina capaz de promover a proliferação em

células endoteliais e está relacionado à grande maioria das desordens angiogênicas conhecidas. Resultados obtidos quase que concomitantemente aos experimentos de expressão gênica através de *microarrays* indicaram que a ALT-C é capaz de estimular a proliferação em células HUVEC (COMINETTI *et al.*, 2004) e estimular a angiogênese *in vivo* de forma dose-dependente (resultados não publicados). A indução da expressão de VEGF observada nos experimentos poderia explicar a estimulação da proliferação celular e da angiogênese, de maneira que análises específicas da expressão de VEGF poderiam auxiliar na elucidação deste mecanismo desencadeado pela ALT-C.

Para tal, foram realizados experimentos de RT-PCR. *Primers* específicos para a seqüência que codifica a isoforma 165 de VEGF humano foram desenhados e sintetizados. Os fibroblastos humanos foram semeados sobre ALT-C ou colágeno tipo I, immobilizados no fundo das placas de Petri ou ainda, foram tratados com ALT-C solúvel e em seguida semeados sobre colágeno. Após o tempo de incubação, o RNA total das células tratadas foi isolado e os experimentos de RT-PCR foram realizados. Os resultados obtidos encontram-se na figura 24.

Os resultados mostram que, tanto em fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I ou ALT-C immobilizada, quanto em fibroblastos previamente incubados com ALT-C solúvel e então semeados sobre colágeno tipo I, ocorre a expressão de VEGF. Como controle endógeno foram utilizados *primers* específicos para a β -actina (figura 24).

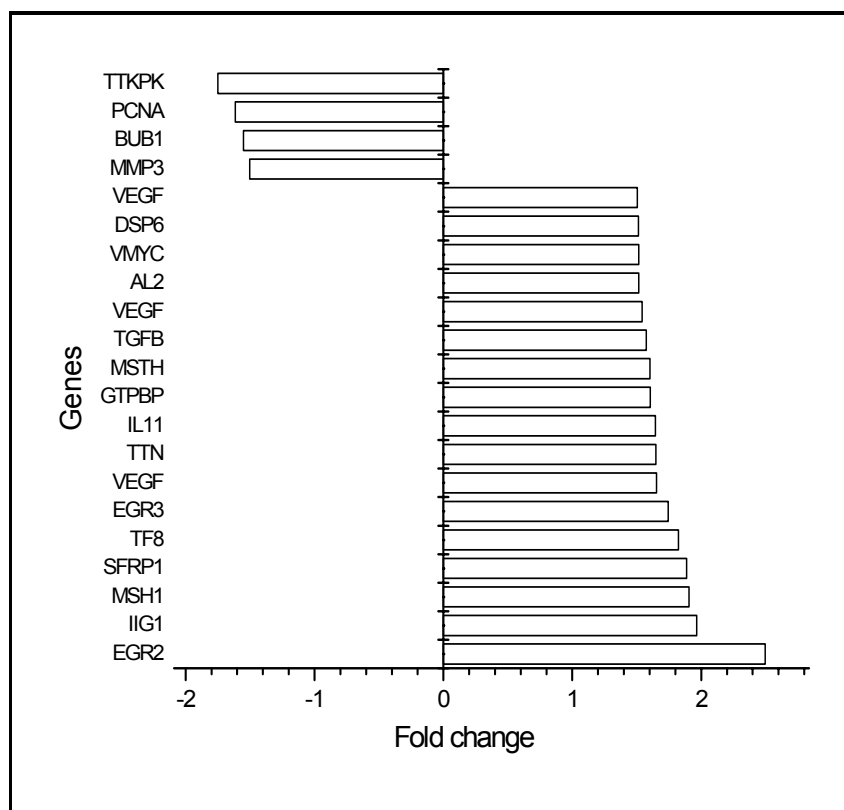


Figura 20 – Diferenças no perfil de expressão de genes relacionados à sinalização e proliferação celular de fibroblastos humanos crescendo sobre ALT-C comparado com fibroblastos crescendo diretamente sobre o plástico. Fibroblastos humanos foram semeados sobre placas cobertas com ALT-C ou diretamente sobre o plástico por 2h. Os fibroblastos foram então lisados e o RNA total foi extraído e cRNA marcado foi sintetizado. Em seguida, o cRNA marcado foi hibridizado nos *GeneChips™* os quais foram em seguida escaneados com o *Affymetrix Gene Array Scanner*. Genes *up* ou *down* regulados em níveis estatísticos significativos ($p < 0,05$) foram considerados como tendo um *fold change* de 1,5 ou maior, comparado com as células controle. TTKPK = TTK protein kinase; PCNA = Proliferating cell nuclear antigen; BUB1 = Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast); MMP3 = Matrix metalloproteinase 3; VEGF = Vascular endothelial growth factor; DSP6 = Dual specificity phosphatase 6; VMYC = V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian); AL2 = Angiopoietin-like 2; TGFB = TGFB inducible early growth response; MSTH = Mesoderm specific transcript homolog (mouse); GTPBP = GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle; IL11 = Interleukin 11; TTN = Tetranectin; EGR-3 = Early growth response 3; TF8 = transcription factor 8; SFRP1 = secreted frizzled-related protein 1; MSH1 = MSH homeo box homolog 1 (drosophila); IIG1 = Insuline induced gene 1; EGR2 = Early growth factor 2. Neste experimento um total de 75 genes foi alterado, sendo 45 *up* regulados e 30 genes foram *down* regulados.

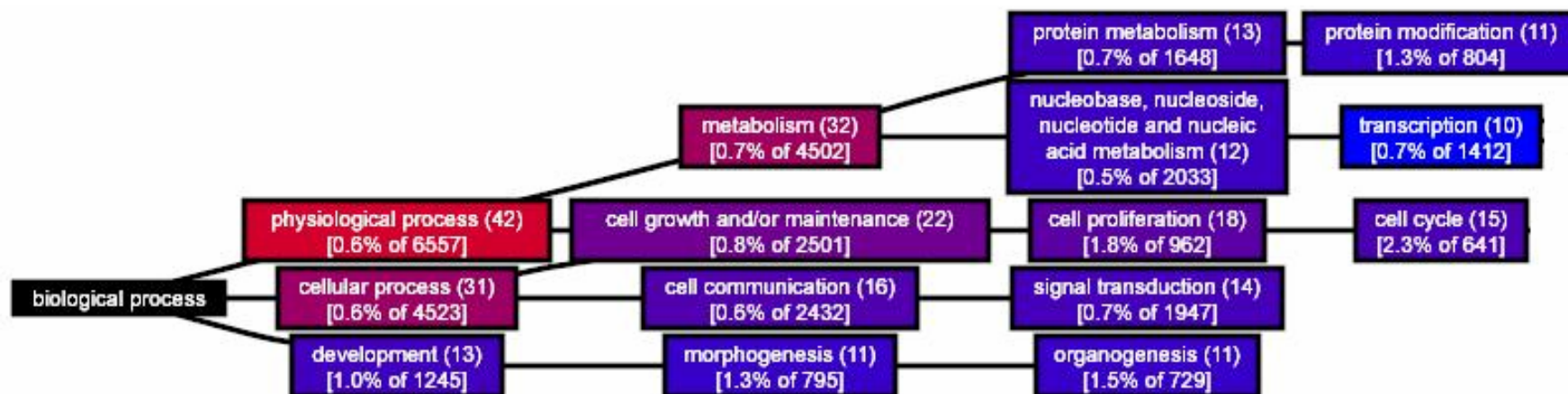


Figura 21 – Gráfico dos processos biológicos, gerado a partir dos genes *up* e *down* regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre o plástico. A cor de cada quadrado do gráfico é baseada no número de genes pertencentes a cada categoria. A cor vermelha representa a categoria com o máximo número de genes, a cor azul indica a categoria com o menor número de genes e os tons de roxo representam as categorias intermediárias. O número entre parênteses indica a quantidade de genes com expressão alterada, dentro de cada processo biológico. Os números abaixo indicam a porcentagem de genes alterados dentro de cada categoria e o número total de genes representado no *Gene Chip* para a categoria. O gráfico foi construído através da página da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

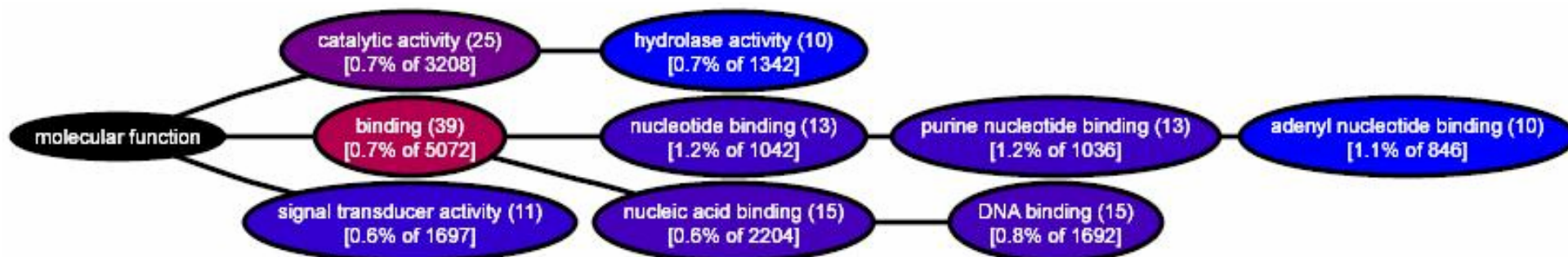


Figura 22 – Gráfico das funções moleculares, gerado a partir dos genes *up* e *down* regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre o plástico. A cor de cada elipse do gráfico é baseada no número de genes pertencentes a cada categoria. A cor vermelha representa a categoria com o máximo número de genes, a cor azul indica a categoria com o menor número de genes e os tons de roxo representam as categorias intermediárias. O número entre parênteses indica a quantidade de genes com expressão alterada, dentro de cada função molecular. Os números abaixo indicam a porcentagem de genes alterados dentro de cada categoria e o número total de genes representado no *Gene Chip* para a categoria. O gráfico foi construído através da página da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

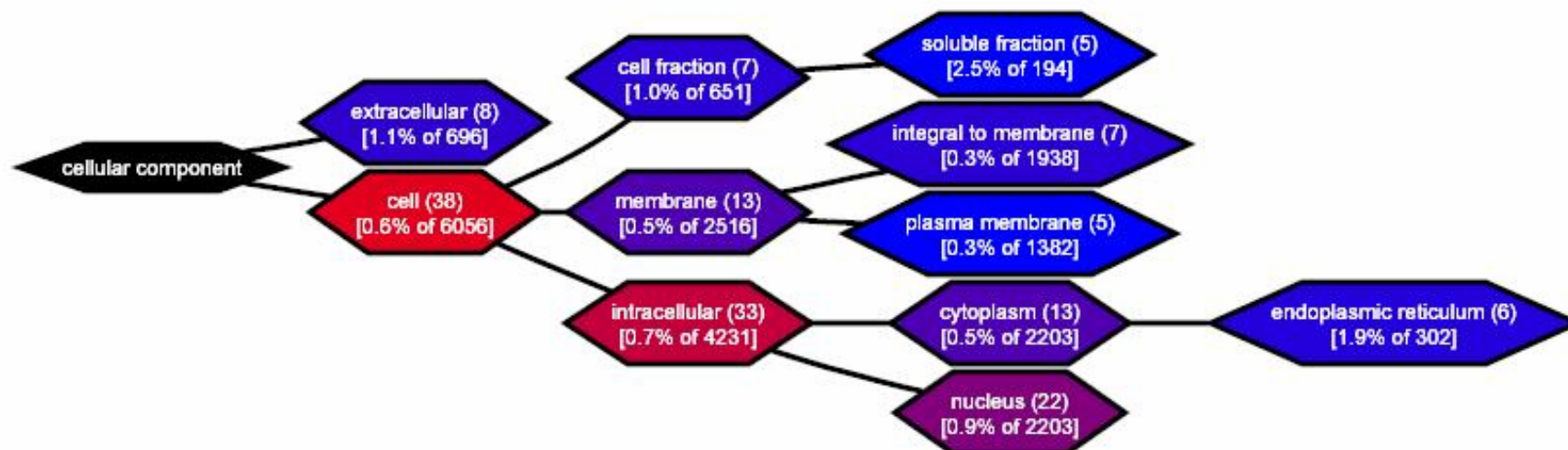


Figura 23 – Gráfico dos componentes celulares, gerado a partir dos genes *up* e *down* regulados em fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado com fibroblastos incubados sobre o plástico. A cor de cada hexágono do gráfico é baseada no número de genes pertencentes a cada categoria. A cor vermelha representa a categoria com o máximo número de genes, a cor azul indica a categoria com o menor número de genes e os tons de roxo indicam as categorias intermediárias. O número entre parênteses indica a quantidade de genes com expressão alterada, dentro de componente celular. Os números abaixo indicam a porcentagem de genes alterados dentro de cada categoria e o número total de genes representado no *Gene Chip* para a categoria. O gráfico foi construído através da página da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

Tabela 5b – Genes down regulados em fibroblastos humanos semeados sobre ALT-C (10µg/ml) comparado com fibroblastos semeados sobre plástico. Para a elaboração da tabela foram escolhidas apenas as classes ontológicas de processos biológicos e função molecular.

GENE	fold change	Processos Biológicos			Função Molecular					
		Processos fisiológicos	Processos celulares	Atividade enzimática	Transdução sinais	Ligante/Receptor	Adesão	Transportador	Atividade motora	Atividade estrutural
matrix metalloproteinase 3	-1,502226	**		**	**					
highly expressed in cancer	-1,506652									
H2A histone family	-1,521129				**					
Cluster Incl. AA013087	-1,5257									
SMC4	-1,543795		**	**	**		**			
histone acetyltransferase 1	-1,54768	**		**	**					
cell division cycle 2	-1,549964	**	**	**	**					
BUB1	-1,552228									
centromere protein F	-1,554147									
integrin, alpha 6	-1,560003				**	**	**			
maternal embrionic kinase	-1,571318	**		**	**					
nuclear RNA helicase	-1,591424				**					
ubiquitin specific protease	-1,593404	**		**						
flap structure-specific endonuclease	-1,600923									
M-phase phosphoprotein	-1,608927				**			**		
proliferating cell nuclear antigen	-1,614224	**	**	**	**					
cyclin A2	-1,642138	**	**							
cell division cycle 2	-1,667201	**	**	**	**					
KIAA1077 protein	-1,677246	**		**						
flap structure-specific endonuclease	-1,69179									
ALCAM	-1,707328				**	**	**			
dihydrofolate reductase	-1,707385			**						
cyclin A2	-1,733847	**	**							
TTK protein kinase	-1,750282	**	**	**	**					
protein kinase, cGMP-dependent	-1,754188	**	**	**	**					
replication factor C	-1,757063				**					
T cell receptor beta variable 17	-1,78418									
H4 histone family, member G	-1,813033				**					
Cluster Incl. AL031058	-1,981465								**	
proenkephalin	-3,197639				**					

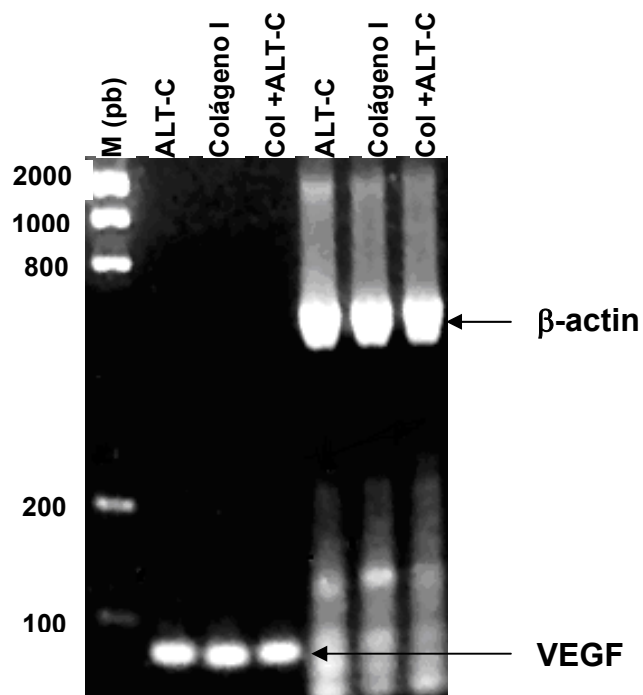


Figura 24 – Indução da expressão de VEGF em fibroblastos humanos pela ALT-C. Os fibroblastos foram incubados sobre ALT-C (10 μ g/ml), colágeno tipo I (Colágeno I, 40 μ g/ml) ou previamente tratados por 30min com ALT-C solúvel (400nM) e então incubados sobre colágeno tipo I (Col + ALT-C). Após 24h de incubação as células foram coletadas e lisadas para o isolamento do RNA total. Experimentos de RT-PCR foram realizados utilizando *primers* específicos para a isoforma 165 de VEGF humano, conforme descrito nos materiais e métodos. *Primers* para β -actina foram utilizados da mesma maneira como controles endógenos.

Para verificar se a expressão de VEGF estimulada pelo tratamento com ALT-C também ocorria em nível protéico, ensaios de ELISA foram realizados, conforme descrito na metodologia. Nestes

experimentos, o conteúdo celular e o meio condicionado foram coletados para serem analisados quanto à presença de VEGF. Os resultados obtidos encontram-se na figura 25.

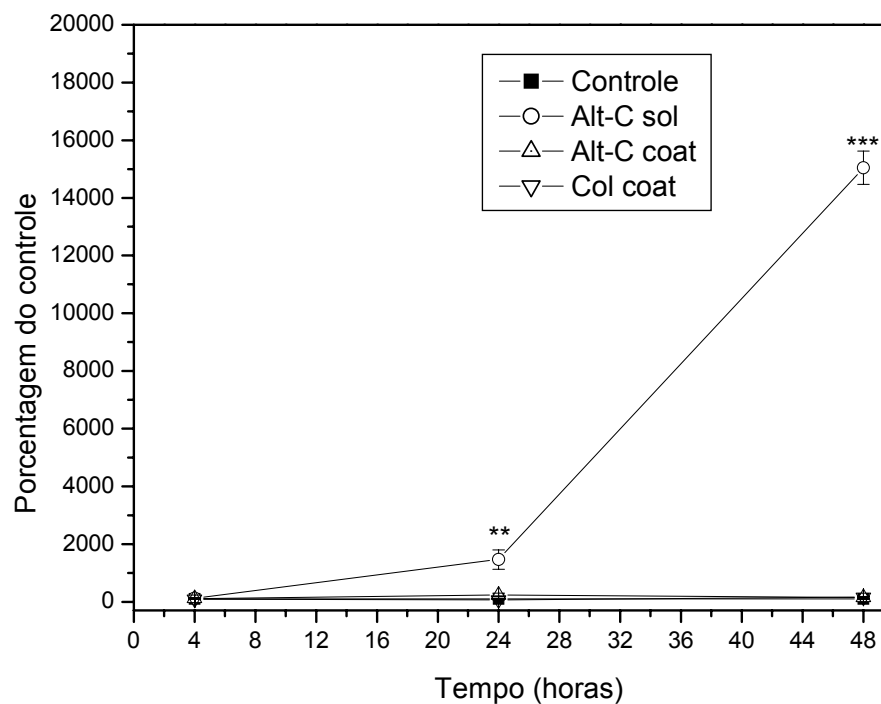


Figura 25 – Indução da expressão de VEGF em fibroblastos humanos pela ALT-C solúvel. Os fibroblastos foram incubados sobre ALT-C (ALT-C coat, 10 μ g/ml), colágeno tipo I (Col coat, 40 μ g/ml) ou previamente tratados por 30min com ALT-C solúvel (400nM) e incubados sobre colágeno tipo I (ALT-C sol). Após 4, 24 ou 48h de incubação o meio condicionado e o conteúdo celular foram coletados. Os ensaios de ELISA para detecção de VEGF foram realizados com o kit *Quantikine Immunoassay*. As barras de erro mostram o erro padrão para dois experimentos independentes realizados em triplicata. O controle representa fibroblastos semeados diretamente sobre o plástico e incubados por 4, 24 e 48h, **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$).

Interessantemente, os resultados obtidos indicam que o nível protéico de VEGF aumenta significativamente após o tratamento de fibroblastos humanos por 24 e 48h com ALT-C solúvel. No tempo de 4h de incubação de ALT-C solúvel com fibroblastos humanos este aumento na expressão de VEGF ainda não é significativamente diferente do observado para células semeadas sobre colágeno ou do controle. Quando os fibroblastos são semeados sobre colágeno tipo I ou sobre ALT-C imobilizada, o nível protéico de VEGF não sofre alterações, comparado ao nível do controle (fibroblastos semeados e incubados sobre plástico durante 4, 24 e 48h) nos intervalos de tempo testados no experimento (figura 25). A presença de VEGF nestes experimentos foi detectada somente no meio condicionado, sendo que no conteúdo celular sua presença não observada.

DISCUSSÃO

Conforme já descrito anteriormente, a alternagina-C (ALT-C) é uma proteína presente no veneno de *Bothrops alternatus* formada pelos domínios desintegrina-*like*(ECD)/rico em cisteína e derivada da alternagina (ALT). A ALT, por sua vez, é uma metaloprotease da classe PIII (SVMP PIII) que sofre processamento proteolítico com a consequente liberação de seu domínio catalítico, produzindo assim a ALT-C. A ALT-C é capaz de inibir a adesão de células K562 transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (células K562 $\alpha_2\beta_1$) ao colágeno tipo I com IC₅₀ de 100nM (SOUZA *et al.*, 2000), além de também inibir a adesão de fibroblastos humanos ao colágeno tipo I com IC₅₀ de 2,2 μ M (COMINETTI *et al.*, 2004). A ALT-C também é capaz de inibir a adesão de células ECV-304, HeLa e MDA-MB-231 ao colágeno tipo I com IC₅₀ de 1,66, 1,38 e 1,3 μ M, respectivamente (resultados não publicados). Contudo, a ALT-C não é capaz de inibir a adesão destas mesmas células K562 (não transfectadas) à fibronectina, nem mesmo de células K562 transfectadas com a integrina α_1 ou de outras linhagens celulares como A5, VNRC3, SW480 e Jurkat aos seus respectivos ligantes naturais (SOUZA *et al.*, 2000), indicando uma especificidade do domínio desintegrina-*like*(ECD) para a integrina $\alpha_2\beta_1$. A ALT-C também não inibe a adesão de células MCF-7 mediada por colágeno tipo I, provavelmente devido a presença de outros receptores

para este ligante na membrana destas células (resultados não publicados).

A ALT-C é também capaz de promover a adesão das células K562($\alpha_2\beta_1$) (SOUZA *et al.*, 2000), de fibroblastos humanos e células HUVEC (COMINETTI *et al.*, 2004) e também de células ECV-304 e HeLa (resultados não publicados), agindo portanto como molécula adesiva. Além disso, a ALT-C, tanto na forma solúvel quanto na forma imobilizada ao plástico, é capaz de promover a proliferação celular em HUVECs. Este efeito não é verificado em fibroblastos de camundongo (COMINETTI *et al.*, 2004) nem mesmo em células das linhagens ECV-304 e HeLa (resultados não publicados), o que poderia indicar uma especificidade de ação da ALT-C para células endoteliais, no que diz respeito à estimulação da proliferação celular. Concentrações de 10 e 100nM de ALT-C são capazes de estimular a angiogênese *in vivo* e a migração de células endoteliais *in vitro*. Contudo, concentrações maiores (1 μ M) são capazes de inibir este efeito e também a proliferação celular em HUVECs (resultados não publicados).

Em experimentos realizados por MARIANO-OLIVEIRA *et al.* (2003), a ALT-C se mostrou capaz de ativar a FAK (*Focal adhesion kinase*) e sua associação com o PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) e além disso, também foi capaz de ativar e aumentar significativamente a translocação da ERK2 (*Extracellular regulated kinase*) do citosol para o núcleo. Em concentrações de 100nM, a ALT-C foi capaz de induzir a

quimiotaxia de neutrófilos de maneira análoga ao fMLP, um clássico agente quimiotáxico. A ALT-C induziu também um aumento no conteúdo de F-actina de neutrófilos sugerindo que a mesma é capaz de dirigir eventos de rearranjo do citoesqueleto nestas células. Portanto, o tratamento de neutrófilos com ALT-C promove a ativação da FAK, o rearranjo do citoesqueleto de actina e estimula a migração destas células. A ativação da ERK2 induzida pelo tratamento com ALT-C poderia explicar o efeito positivo na migração celular dos neutrófilos (MARIANO-OLIVEIRA *et al.*, 2003). A ERK2 pertence à família das MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) que compõem um grupo de proteínas quinase que fosforilam resíduos específicos de serina e treonina nas proteínas alvo (substratos) e assim regulam atividades de expressão gênica, mitose, migração, proliferação e morte celular (LIN *et al.*, 1997; MIYAMOTO *et al.*, 1996; APLIN & JULIANO, 1999; JOHNSON & LAPADAT, 2002). A ERK2 pode regular diretamente a função da quinase de cadeia leve da miosina (*Miosin light chain kinase* – MLCK), uma enzima fortemente associada com o controle da motilidade celular (KLEMKE *et al.*, 1997). A miosina II é a responsável pela motilidade em células não musculares e é composta por duas cadeias pesadas e dois conjuntos de cadeias leves (JAY *et al.*, 1995). A função da miosina II é regulada através da fosforilação de suas cadeias leves pela MLCK. Desta forma, a ERK2 regula a motilidade celular indiretamente, através de sua habilidade de influenciar a MLCK.

A ALT-C também promoveu um aumento na fosforilação da Akt em células HUVEC, a qual foi bloqueada com o uso de inibidores de PI3K ou da proteína quinase C (PKC). A ligação do domínio desintegrina-*like*(ECD) da ALT-C com integrinas presentes em células endoteliais inicia, portanto, cascatas de sinalização que poderiam levar a ativação da via de sobrevivência PI3K→Akt (COMINETTI *et al.*, 2004). A Akt é um importante regulador da viabilidade celular (DUDEK *et al.*, 1997; KENNEDY *et al.*, 1997). A ligação de moléculas a receptores com atividade intrínseca ou indiretamente acoplados a tirosinas quinase, como é o caso das integrinas, gera sinais intracelulares que ativam vias de sobrevivência (DATTA *et al.*, 1999). A ativação destes receptores resulta no recrutamento do PI3K para a superfície interna da membrana plasmática. Uma vez localizados na membrana, o PI3K catalisa a transferência de um fosfato da molécula de ATP para a posição D3 no anel de inositol de fosfoinosítídeos também localizados na membrana, gerando fosfoinosítídeos fosforilados. Uma vez formados, estes lipídeos agem como segundo mensageiros que regulam cascatas de transdução de sinais e são capazes de ativar vários intermediários celulares, como tirosinas quinase, GTPases e serina/treoninas quinase como a Akt (RAMEH & CANTLEY, 1999). A Akt possui um domínio central com atividade catalítica (quinase) específica para resíduos de serina ou treonina nas proteínas-alvo (BELLACOSA *et al.*, 1991). Sabe-se que diversos estímulos fisiológicos são capazes de induzir a atividade

enzimática da Akt, de maneira dependente de PI3K. Outra forma de regulação da sobrevivência celular desempenhada pela Akt ocorre através da ligação com proteínas relacionadas à maquinaria apoptótica. A Akt é capaz de fosforilar a caspase 9 e a Bad (proteína da família da Bcl-2, com atividade pró-apoptótica) e promover sua inativação (DATTA *et al.*, 1999).

Todos os resultados descritos acima indicam que a ALT-C é uma molécula com propriedades bastante interessantes, podendo agir como fator de sobrevivência e como estimuladora da proliferação de células endoteliais, agindo também na indução da angiogênese *in vivo*. De posse destes dados e com o objetivo de analisar os efeitos da ALT-C em um espectro maior de atividade, a mesma foi testada em ensaios de expressão gênica em fibroblastos humanos em cultura. Para isto, a ALT-C foi testada na forma imobilizada, servindo como substrato de adesão para estas células. Ensaios com a ALT-C solúvel também foram realizados, mas como já citado anteriormente, devido a problemas de hibridização com os *GeneChips*TM os ensaios não puderam ser finalizados. Na forma imobilizada, o efeito da ALT-C na expressão gênica dos fibroblastos foi comparado tanto com o efeito produzido nas células incubadas sobre colágeno, quanto com os efeitos produzidos nas células incubadas diretamente sobre o plástico. No primeiro caso, dos 12 genes alterados, 8 tiveram sua expressão aumentada (*up*-regulados) e 4 tiveram a expressão diminuída (*down*-regulados).

De posse destes dados foi possível realizar análises de ontologia gênica (GO) dos genes *up* ou *down* regulados. A GO, como já citado, é uma ferramenta padrão amplamente aceita que serve para classificar genes específicos em três diferentes categorias: (1) sua função molecular, (2) o processo biológico que participam e (3) de acordo com o componente celular em que estão localizados. É importante perceber que um produto gênico pode apresentar uma ou mais funções moleculares, assim como pode participar de um ou mais processos biológicos e também estar associado a um ou mais componentes celulares. Ao contrário, produtos gênicos diferentes podem dividir a mesma função molecular, atuar nos mesmos processos biológicos e pertencer ao mesmo compartimento celular. Desta maneira é bastante provável o surgimento de sobreposições de classes ontológicas na análise dos dados (<http://www.geneontology.org/>).

A função molecular de um gene descreve suas atividades, tais como as atividades catalíticas ou de ligação, em um nível molecular. Os termos de ontologia gênica para função molecular descrevem atividades e não as entidades (moléculas ou complexos moleculares) responsáveis por sua atividade e não especificam aonde, quando ou em qual contexto sua ação acontece. Um processo biológico é sempre acompanhado de uma ou mais entidades ordenadas de funções moleculares e não representa uma via metabólica, apenas classifica um ou mais produtos gênicos como participantes ou não de tal processo. O

componente celular descreve a qual estrutura anatômica da célula o produto gênico faz parte (<http://www.geneontology.org/>).

Segundo análises de GO, foi possível construir gráficos relacionando os genes alterados após incubação sobre ALT-C immobilizada, com processos biológicos, funções moleculares ou componentes celulares. O perfil de expressão gênica de fibroblastos humanos incubados sobre ALT-C comparado ao perfil de expressão de com fibroblastos incubados sobre colágeno tipo I estão relacionados com a classe dos processos fisiológicos e celulares e de acordo com sua função molecular, formam produtos gênicos que agem como moléculas transportadoras, ligantes/carreadoras ou com atividade catalítica e que estão localizados na membrana ou intracelularmente. O significado biológico destes resultados permanece obscuro, contudo é importante salientar que apenas uma quantidade muito pequena de genes do total presente nos *arrays* teve sua expressão modificada. Das aproximadamente 10.000 seqüências gênicas específicas presentes no *GeneChipTM*, apenas doze deles tiveram sua expressão significativamente alterada, o que indica fortemente uma similaridade de ação entre estas duas moléculas, ALT-C e colágeno tipo I, com relação aos efeitos de expressão produzidos nos fibroblastos humanos, quando na forma immobilizada nas placas de Petri.

ZIGRINO *et al.* (2002), em experimentos realizados com a jararagina, observaram que sua ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$ da membrana de

fibroblastos humanos, resultou em efeitos muito semelhantes àqueles produzidos pelo colágeno, no que diz respeito a eventos de sinalização com a *up* regulação de metaloproteases de matriz. Os resultados de expressão gênica dos fibroblastos humanos crescendo sobre ALT-C estão, portanto, em concordância com a idéia destes autores, de que proteínas com domínios desintegrina-*like* poderiam agir como análogas ao colágeno, fornecendo sinais de sobrevivência às células. No entanto, nossos resultados evidenciaram que a ALT-C na forma solúvel não é simplesmente um mimetizante do colágeno conforme se referem estes autores, pois o efeito na expressão do VEGF a diferenciou de maneira importante do colágeno imobilizado.

Quando se analisa o perfil de expressão gênica em fibroblastos incubados sobre ALT-C comparado com o perfil de expressão gênica de fibroblastos incubados sobre o plástico, o número de genes com expressão alterada aumenta bastante. Neste modelo, 75 genes apresentam-se significativamente alterados, sendo que destes, 45 são *up* regulados e 30 são *down* regulados. O gene *up* regulado que teve o maior *fold change* (2,49) foi o *Early growth response 2* (EGR2). O gene *down* regulado com o maior *fold change* (-3,19) foi a pró-encefalina. O EGR2 pertence a uma família de fatores reguladores da transcrição gênica que formam a base da plasticidade neuronal. Existem quatro membros pertencentes a esta família (EGR1, 2, 3 e 4), sendo que todos possuem domínios altamente conservados de ligação ao DNA e, uma vez ligados a

uma região relativa a um segmento gênico específico nesta molécula, são capazes de participar na regulação de sua expressão através de um processo ainda não totalmente conhecido (O'DONOVAN *et al.*, 1999). O significado biológico deste resultado, desencadeado pelo tratamento dos fibroblastos humanos com ALT-C, permanece desconhecido. Entretanto sabe-se que os EGR2 e 3 são capazes de estimular vários fatores de transcrição associados com a proliferação celular como o c-Fos, SRF e c-myc (ZENG *et al.*, 2003).

Em análises de *microarrays* para estudar os efeitos de níveis sub-patológicos dos venenos das serpentes *Crotalus atrox* e *B. jararaca* sobre o perfil da expressão gênica em células HUVEC em cultura, GALLAGHER *et al.* (2003) observaram que o gene *up* regulado com o maior *fold change* (19,9 e 25,4 para *C. atrox* e *B. jararaca*, respectivamente) foi o EGR3. O EGR3 está envolvido na ativação do promotor ligante de Fas. Outro membro desta família de reguladores da transcrição gênica, o EGR1, também foi *up* regulado após o tratamento de células HUVEC com ambos os venenos. Vários genes que tiveram sua expressão alterada nas células endoteliais tratadas com os venenos das serpentes citadas estão envolvidos em vias apoptóticas e os autores sugerem que a apoptose celular induzida pela ação do veneno ocorre predominantemente através da via mediada pelo ligante de Fas e não pela via do TNF- α , como previamente considerado (GALLAGHER *et al.*, 2003). O EGR3 também foi *up* regulado nos fibroblastos semeados sobre

ALT-C com um *fold change* de 1,74. Contudo, a maioria dos genes *up* regulados pelo tratamento com ALT-C imobilizada faz parte das classes relacionadas a eventos de crescimento celular/manutenção (22 genes) e comunicação celular (16 genes) no que diz respeito à ontologia dos processos biológicos.

A interleucina 11 (IL-11), o *Transforming growth factor* β (TGF β) e os EGR2 e 3 são fatores de crescimento envolvidos na proliferação celular. A IL-11 induz a proliferação em linfócitos humanos (CURTI *et al.*, 2002), estimula a hematopoiese e inibe a apoptose em uma variedade de tipos celulares (LENG & ELIAS, 1997). O TGF β regula várias proteínas inibidoras do ciclo celular, tais como p27 e p15 (LLOYD, 1997). Estes resultados chamaram a atenção para um possível papel da ALT-C como iniciadora de vias de sinalização específicas que pudessem levar a proliferação celular. Uma característica notável nos resultados obtidos foi o aumento da expressão do VEGF, uma potente citocina com função de crescimento, sobrevivência, migração e adesão em células vasculares (SENGER *et al.*, 1983, 1990; ALON *et al.*, 1995; PIERCE *et al.*, 1996; GERBER *et al.*, 1998; BYZOVA *et al.*, 2000; SENGER, 2001). O VEGF também está intimamente ligado a angiogênese em vários tipos de câncer e parece possuir importantes funções na progressão do tumor (FOLKMAN & SHING, 1992; KRAFT *et al.*, 1999).

O aparecimento de mais de um *probe set* para o VEGF, ou seja a ocorrência de mais de um gene de VEGF *up* regulado ocorre pois

no *GeneChip*TM pode haver mais de uma seqüência de nucleotídeos representando tal gene. Este fato pode confirmar o aumento na regulação da expressão de VEGF em fibroblastos tratados com ALT-C, uma vez que três seqüências gênicas codificantes para o VEGF apareceram alteradas em tais experimentos. Para avaliar o efeito da ALT-C especificamente sobre a expressão de VEGF, reações de RT-PCR foram montadas. Os fibroblastos humanos foram semeados e incubados por 24h sobre colágeno tipo I ou ALT-C imobilizados, ou previamente tratados por 30min com ALT-C solúvel e então semeados sobre colágeno tipo I e incubadas pelo mesmo período de tempo. Os resultados demonstram que em todas as condições citadas acima, houve a produção de mRNA codificante para o VEGF.

Ensaio para a determinação dos níveis protéicos de VEGF intra ou extracelulares em fibroblastos tratados com ALT-C também foram realizados, através de experimentos de ELISA. Para a coleta do conteúdo celular foi utilizado tampão de lise contendo inibidores de proteases com a finalidade de preservar a estrutura e função da contingência de proteínas intracelulares, de modo que, havendo a presença de VEGF, o mesmo pudesse ser detectado. Tanto o meio condicionado, quanto o conteúdo celular foram mantidos em temperatura de -80°C até o momento dos ensaios. Nestes experimentos, o conteúdo celular não apresentou sequer indícios da presença de VEGF, indicando que o mesmo, apesar de obviamente ser produzido no interior das células, é posteriormente

secretado para o meio condicionado, nos períodos de tempo testados no experimento (4, 24 e 48h). A expressão de VEGF nestes ensaios foi alterada, comparada com o controle, somente quando a ALT-C solúvel foi tratada com os fibroblastos. Enquanto que em células crescidas sobre ALT-C ou colágeno tipo I imobilizados, o nível protéico de VEGF foi semelhante ao do controle (fibroblastos sem tratamento, semeados e incubados sobre o plástico nos intervalos de 4, 24 e 48h). É importante observar que, comparado ao controle, o aumento da quantidade de VEGF em células tratadas com ALT-C solúvel chega a mais de 1.500% no tempo de 24h de incubação com os fibroblastos e a aproximadamente 15.000% no tempo de 48h de incubação. Estes resultados mostram claramente o efeito da ALT-C solúvel na indução da expressão de VEGF em fibroblastos humanos.

Os experimentos de *microarrays* poderiam não ter revelado níveis tão altos de expressão de VEGF por dois principais motivos. Primeiro, a incubação dos fibroblastos humanos não foi realizada com a ALT-C solúvel, mas sim, os mesmos foram semeados e incubados sobre ALT-C imobilizada. Segundo, o tempo de incubação dos fibroblastos com a ALT-C foi de apenas 2h, sendo que os níveis mais altos de VEGF detectados nos experimentos de ELISA foram ao intervalo de 48h de incubação.

As diferenças observadas entre a expressão de VEGF em células incubadas com ALT-C imobilizada e solúvel levanta

questionamentos sobre os possíveis motivos que poderiam levar a este resultado. A ausência de expressão de VEGF com a ALT-C imobilizada ao plástico ocorreria pois sítios importantes neste processo não estariam disponíveis aos fibroblastos. Na forma solúvel estas regiões estariam acessíveis e a estimulação de eventos de sinalização, culminando no aumento na expressão de VEGF, poderia ocorrer.

Sabe-se que diferentes regiões das SVMP PIII podem se ligar a integrina $\alpha_2\beta_1$. IVASKA *et al.* (1999) demonstraram que peptídeos com a seqüência RKKH, derivados do domínio metaloprotease da jararagina e da catrocolastatina foram capazes de se ligar fortemente ao domínio I da subunidade α_2 das integrinas, inibindo desta forma sua interação com outros ligantes. O domínio I é a região responsável pela ligação da integrina $\alpha_2\beta_1$ ao seu ligante, colágeno tipo I. Contudo, a região de ligação mais característica nestas proteínas é o motivo ECD presente no domínio desintegrina-*like*. Porém, o domínio rico em cisteína também pode atuar nesta ligação. O domínio rico em cisteína recombinante da atrolisina A, presente no veneno de *C. atrox*, é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno, indicando portanto, a capacidade deste domínio em se ligar a integrina $\alpha_2\beta_1$ (JIA *et al.*, 1997). Analisando sob este aspecto, podemos criar hipóteses de que, quando a ALT-C é imobilizada sobre o plástico, o responsável pelos eventos de adesão dos fibroblastos seria o domínio rico em cisteína e seu domínio

desintegrina-*like* não estaria acessível para iniciar eventos de sinalização, impossibilitando assim a indução da expressão do VEGF. Tal fato não ocorreria com a ALT-C solúvel e o domínio desintegrina-*like* ficaria livre para exercer suas funções sobre os fibroblastos. Experimentos de competição com anticorpos produzidos especificamente contra os domínios desintegrina-*like* e/ou rico em cisteína poderiam ser úteis no esclarecimento de tal questão.

Permanece intrigante a diferença observada entre os experimentos de ELISA durante o tempo de incubação de 24h com ALT-C solúvel e os experimentos de RT-PCR – aonde o tempo de incubação das células foi também de 24h – que não detectaram diferenças na quantidade de mRNA para VEGF entre os tratamentos. O esperado seria uma maior quantidade de mRNA codificante para o VEGF nas células tratadas com ALT-C solúvel comparada à quantidade de mRNA em células semeadas e incubadas sobre ALT-C e colágeno imobilizados. Experimentos mais sensíveis de RT-PCR em tempo real poderiam auxiliar na elucidação destes fatos. Tentativas de realização de tais experimentos foram feitas junto ao laboratório do professor Dr. Gustavo Goldman, na Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto. Contudo, devido a problemas nos *primers* dos controles endógenos, os experimentos não puderam ser finalizados.

A angiogênese tem sido focalizada recentemente em trabalhos sobre desintegrinas e outros componentes dos venenos. A forte

inibição, causada pelas desintegrinas, da ligação da integrina ao seu ligante natural, sugere intensamente a possibilidade de utilização destas proteínas como protótipos de fármacos anti-metastáticos. De fato, algumas patentes sobre uso de desintegrinas como anti-trombóticos e anti-metastáticos estão em desenvolvimento. No entanto, conforme demonstram os resultados obtidos por COMINETTI *et al.*, (2004) a ALT-C pode atuar tanto como pró-, quanto como anti-angiogênico, dependendo da dose utilizada. O efeito pró-angiogênico ocorreria provavelmente pela indução da expressão de VEGF.

Pelo que é de nosso conhecimento, relatos sobre desintegrinas de venenos de serpente capazes de induzir a expressão de VEGF são raros, se não inexistentes. Sabe-se contudo, que o próprio veneno pode conter suas próprias moléculas homólogas ao VEGF. O primeiro relato de uma molécula homóloga ao VEGF em venenos de serpente foi realizado por KOMORI *et al.* (1999) que descreveram a seqüência de aminoácidos do fator hipotensivo (HF) purificado do veneno de *Vipera aspis aspis*. Através de análises de sua seqüência completa de aminoácidos os autores verificaram uma identidade de 45% com o VEGF. Aplicado em injeções intra-dermais em ratos, o HF foi capaz de aumentar a permeabilidade capilar de modo semelhante ao VEGF. O HF também atuou como agente mitogênico em células endoteliais de aorta bovina e como potente agente diminuidor da pressão sanguínea (KOMORI *et al.* 1999). É interessante observar que a atividade de permeabilidade

vascular induzida pelo HF é cerca de dez vezes mais potente do que seus efeitos mitogênicos nas células endoteliais. Por esta razão o aumento da permeabilidade vascular pode ser considerado a principal ação das moléculas homólogas ao VEGF em venenos de serpente (JUNQUEIRA DE AZEVEDO *et al.*, 2001).

GASMI *et al.* (2000, 2002) também isolaram uma proteína com atividade de aumento da permeabilidade capilar (ICPP) do veneno de *Vipera lebetina*. A ICPP, através de análises de sua seqüência completa de aminoácidos, também apresentou alta homologia com o VEGF, com 52% de identidade. A ICPP é um potente fator angiogênico *in vitro* para células HUVEC e células tronco embrionárias de camundongos. A ICPP também foi capaz de ativar a via da MAPK e de reiniciar a síntese de DNA nestas mesmas linhagens celulares. Além de homólogas ao VEGF, a ICPP isolada do veneno de *Vipera lebetina* e o HF isolado do veneno de *Vipera aspis aspis*, apresentaram também alta homologia entre si (GASMI *et al.*, 2002).

A vamina isolada do veneno de *Vipera ammodytes ammodytes* e a VR-1 isolada de *Daboia russelli russelli* também apresentaram homologia com membros da família do VEGF, com 47,6 e 48,1% de identidade, respectivamente (YAMAZAKI *et al.*, 2003). Ambas as proteínas foram capazes de estimular a proliferação de células endoteliais em cultura, sendo até mais efetivas do que o VEGF neste efeito. A administração intravascular em camundongos de ambas as

proteínas induziu uma rápida e dramática hipotensão que alcançou níveis máximos de 3 a 5 minutos após a injeção. As pressões sanguíneas diastólicas e sistólicas conseqüentemente, foram diminuídas após o tratamento com as proteínas em níveis mais efetivos comparados aos efeitos do VEGF, indicando que estas proteínas exibem atividades hipotensivas mais eficazes do que o próprio VEGF (YAMAZAKI *et al.*, 2003). A presença de moléculas semelhantes ao VEGF também foi detectada em serpentes do gênero *Bothrops*. JUNQUEIRA DE AZEVEDO *et al.* (2001) caracterizaram seqüências de DNA codificantes para VEGF a partir de uma biblioteca de cDNA construída a partir do RNA extraído das glândulas veneníferas de *B. insularis*.

Os efeitos provocados pelo envenenamento através da picada de serpentes incluem necrose local, hemorragia local e sistêmica, hipotensão, edema local, coagulopatias e fibrin(ogen)ólise (CARDOSO *et al.*, 1993). Vasodilatação local, aumento na permeabilidade vascular e a hipotensão, características de acidentes botrópicos, são efeitos atribuídos às cininas liberadas pelo cininogênio circulante através da ação de enzimas semelhantes a calicreína presentes no veneno (ROCHA E SILVA *et al.*, 1966). Ainda, peptídeos potenciadores da bradicinina, que inibem a enzima conversora de angiotensina, impedindo a transformação da angiotensina I em angiotensina II, e os peptídeos natriuréticos, são também tidos como os responsáveis por estes efeitos. Atualmente, as

moléculas homólogas ao VEGF estão sendo acrescentadas a esta lista de proteínas de veneno que interferem com a homeostasia.

Interessantemente, moléculas homólogas ao VEGF não foram observadas no veneno de uma espécie de aranha (*Loxosceles deserta*) contudo, o tratamento de queratinócitos com tal veneno foi capaz de induzir a expressão de VEGF nestas células, o que poderia explicar os efeitos de vasodilatação, edema e eritema observados após o envenenamento pela picada da aranha (DESAI *et al.*, 2000).

Uma explicação evolutiva para a presença de moléculas semelhantes ao VEGF nos venenos de serpente seria a de que a seleção de toxinas associadas a potentes fatores de permeabilidade vascular poderia ser crucial para a rápida disseminação das toxinas na corrente sanguínea da presa ou à indução de choque. A presença de moléculas capazes de elevar os níveis de VEGF nas células seria uma possível alternativa evolutiva encontrada pelas espécies de serpente durante o ataque à presa. A combinação de moléculas de VEGF do próprio veneno e a indução da expressão de VEGF nas células da presa poderia aumentar os efeitos locais e sistêmicos verificados após o envenenamento.

Como já citado, a presença em venenos de serpente de desintegrinas indutoras da expressão de VEGF é rara. ABDEL-AZIZ *et al.* (2003) estudaram os efeitos de indutores da heme-oxigenase 1 na expressão de citocinas como o VEGF e o TGF- β . Nestes estudos, os

autores verificaram que o tratamento de células endoteliais de pulmão de ratos com uma SVMP (1 μ g/ml) por 24h é capaz de aumentar a expressão de VEGF. Contudo, os autores não citam ou descrevem em maiores detalhes qual SVMP foi utilizada nos experimentos.

Recentemente foi demonstrado que a agretina, uma proteína com função de agregação plaquetária e homóloga a lectinas do tipo C, isolada do veneno de *Calloselasma rhodostoma*, é capaz de induzir a angiogênese via expressão de VEGF. A agretina é um agonista da ligação da integrina $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno e é capaz de estimular a proliferação e a migração de células HUVEC, levando à ativação das vias do PI3K, Akt e ERK1/2 (CHUNG *et al.*, 2004). Estes resultados, juntamente com os dados de COMINETTI *et al.* (2004), sugerem fortemente que a ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$ em células HUVEC é um estímulo proliferativo.

Conforme os resultados discutidos acima, é possível criar hipóteses de que a ALT-C seria capaz de iniciar eventos de sinalização celular similares aos eventos desencadeados por integrinas e deste modo, agir sobre vários processos fisiológicos. A ALT-C, dependendo da dose, poderia atuar como fator de sobrevivência, através da ativação da via PI3K→Akt e além disso, como fator estimulador da proliferação celular e da angiogênese, através da elevação dos níveis de VEGF. Estas características demonstram que a ALT-C pode ser uma ferramenta muito

útil no estudo de vias de transdução de sinais em diferentes tipos celulares e no estudo de moléculas candidatas a fatores angiogênicos, especialmente nos casos aonde se busca o crescimento de nova vasculatura, como em doenças coronárias ou isquemias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AZIZ, M.T.; EL-ASMAR, M.F.; EL-MILIGY, D.; ATTA, H.; SHAKER, O.; GHATTAS, M.H.; HOSNI, H.; KAMAL, N. Retrovirus-mediated human heme oxygenase-1 (HO-1) gene transfer into rat endothelial cells: the effect of HO-1 inducers on the expression of cytokines. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 35, p. 324-332, 2003.
- ALBELDA, S.M.; METTE, S.A.; ELDER, D.E.; STEWART, R.M.; DAMJANOVICH, L.; HERLYN, M.; BUCK, C.A. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the β_3 subunit with tumor progression. **Cancer Res.** v. 50, p. 6757-6764, 1990.
- ADLER, M.; LAZARUS, M.A.; DENNIS, M.S.; WAGNER, G. Solution structure of kistrin, a potent platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. **Science** v. 253, 445-448, 1991.
- ALMEIDA, E.A.; HUOVILA, A.P.; SUTHERLAND, A.E.; STEPHENS, L.E. CALARCO, P.G. SHAW, L.M. MERCURIO, A.M.; SONNENBERG, A.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. **Cell** v. 81, p. 1095-1104, 1995.
- ALON, T.; HEMO, I.; ITIN, A.; PE'ER, J.; STONE, J.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. **Nat Med.** v, 10, p. 1024-1028, 1995.
- APLIN, A.E; JULIANO, R.L. Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. **J. Cell Biol.** v. 112, 695-706, 1999.
- ASHBURNER, M.; BALL, C.A.; BLAKE, J.A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J.M.; DAVIS, A.P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S.S.; EPPIG, J.T.; HARRIS, M.A.; HILL, D.P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J.C.; RICHARDSON, J.E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G.M.; SHERLOCK, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat Genet.** v. 25, p. 25-29, 2000.
- ASSAKURA, M.T.; SILVA, C.A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A.C.; SERRANO, S.M. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Toxicon** v. 41, p. 217-227, 2003.

- BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASSON, J.B.; FOX, J.W. Identification of the cleavage sites by a hemorrhagic metalloproteinase in type IV collagen. **Matrix** v. 10, p. 91-97, 1990.
- BAUER, J.S.; VARNER, J.; SCHREINER, C.; KORNBERG, L.; NICKOLAS, R.; JULIANO, R.L. Functional role of the cytoplasmic domain of the integrin $\alpha 5$ subunit. **J. Cell Biol.** v. 122, p. 209-221, 1993.
- BELLACOSA, A.; TESTA, J.R.; STAAL, S.P.; TSICHLIS, P.N. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. **Science** v. 254, p. 274-277, 1991.
- BEVIGLIA, L.; GWENDOLYN, J.S.; NIEWIAROWSKI, S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol. Res.** v. 7, p. 7-20, 1995.
- BIGLER, D.; TAKAHASHI, Y.; CHEN, M.S.; ALMEIDA, E.A.; OSBOURNE, L.; WHITE, J.M. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. **J. Biol Chem.** v. 275, p. 11576-11584, 2000.
- BJARNASON, J.B.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. **Biochem.** v. 17, p. 3395-3404, 1978.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.** v. 62, p. 325-372, 1994.
- BLACK, R.A.; WHITE, J.M. ADAMs: focus on the protease domain. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 10, p. 654-659, 1998.
- BLOBEL, C.P.; WOLFSBERG, T.G.; TRUCK, C.W.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J.M. A potential fusion peptide and an integrin domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature** v. 356, p. 248-252, 1992.
- BODE, W.; GOMIS-RUTH, F.X.; STOCKLER, W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Lett.** v. 331, p. 134-140, 1993.

- BORKOW, G.; GUTIERREZ, J.M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon** v. 31, p. 1137-1150, 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROOKS, P.C.; STROMBLAD, S.; KLEMKE, R.; VISSCHER, D.; SARKAR, F.H.; CHERESH, D.A. Antiintegrin $\alpha_v\beta_3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. **J. Clin. Invest.** v. 96, p. 1815-1822, 1995.
- BROOKS, P.C.; MONTGOMERY, A.M.P.; ROSENFELD, M.; REISFELD, R.A.; HU, T.; KLIER, G., CHERESH, D.A. Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell** v, 79, p. 1157-1164, 1994.
- BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. Focal adhesions, contractility, and signaling. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 12, p. 463-519, 1996.
- BYZOVA, T.V.; GOLDMAN, C.K.; PAMPORI, N.; THOMAS, K.A.; BETT, A.; SHATTIL, S.J.; PLOW, E.F. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of integrins. **Mol. Cell Biol.** v. 6, 851-860, 2000.
- CALVETE, J.J. WANG, Y.; MANN, K.; SCHAFER, W.; NIEWIAROWSKI, S.; STEWART, G.J. The disulphide bridge pattern of snake venom disintegrins, flavoridin and echistatin. **FEBS Lett.** v. 309, p. 316-320, 1992.
- CALVETE, J.J.; SCHRADER, M.; RAIDA, M.; McLANE, M.A.; ROMERO, A.; NIEWIAROWSKI, S. The disulphide bond pattern of bitistatin, a disintegrin isolated from the venom of the viper *Bitis arietatus*. **FEBS Lett.** v, 416, p. 197-202, 1997.
- CALVETE, J.J.; JÜRGENS, M.; MARCINKIEWICZ, C.; ROMEROS, A.; SCHRADER, M.; NIEWIAROWSKI, S. Disulphide-bond pattern and molecular modeling of the dimérica disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin $\alpha_5\beta_1$ antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. **Biochem. J.** v. 345, p. 573-581, 2000.

- CALVETE, J.J.; FOX, J.W.; AGELAN, A.; NIEWIAROWSKI, S.; MARCINKIEWICZ, C. The presence of the WGD motif in CC8 heterodimeric disintegrin increases its inhibitory effect on $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. **Biochem.** v. 41, p. 2014-2021, 2002.
- CALVETE, J.J.; MORENO-MURCIANO, M.P.; THEAKSTON, R.D.G.; KISIEL, D.G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem. J.** v. 372, p. 725-734, 2003.
- CAMPER, L.; HELLMAN, U.; LUNDGREN-AKERLUND, E. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. **J Biol Chem.** v. 273, p. 20383-20389, 1998.
- CARDOSO, J.L.; FAN, H.W.; FRANCA, F.O.; JORGE, M.T.; LEITE, R.P.; NISHIOKA, S.A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; SANTORO, M.L. *et al.* Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. **Q J Med.** v. 86, p. 315-325, 1993.
- CARMELIET, P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. **Nat Rev Genet.** v. 4, p. 710-720, 2003.
- CHEN, H.C.; APPEDDU, P.A.; PARSONS, J.T.; HILDEBRAND, J.D.; SCHALLER, M.D.; GUAN, J.L. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 16995-17016, 1995.
- CHIANG, H.S.; SWAIM, M.W.; HUANG, T.F. Characterization of platelet aggregation induced by human colon adenocarcinoma cells and its inhibition by snake venom peptides, trigramin and rhodostomin. **Br. J. Haematol.** v. 87, p. 325-331, 1994.
- CHIANG, H.S.; YANG, R.S.; HUANG, T.F. The Arg-Gly-Asp-containing peptide, rhodostomin, inhibits in vitro cell adhesion to extracellular matrices and platelet aggregation caused by Saos-2 human osteosarcoma cells. **Br. J. Cancer.** v. 71, p. 265-270, 1995.
- CHIANG, H.S.; YANG, R.S.; HUANG, T.F. Thrombin enhances the adhesion and migration of human colon adenocarcinoma cells via increased beta3 integrin expression on the tumour cell surface and their inhibition by the snake venom peptide, rhodostomin. **Br. J. Cancer.** v. 73, p. 902-908, 1996.

- CHO, C.; BUNCH, D.O.; FAURE, J.E.; GOULDING, E.H.; EDDY, E.M.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . **Science** v. 281, p. 1857-1859, 1998.
- CHOQUET, D.; FELSENFELD, D.P.; SHEETZ, M.P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. **Cell** v. 88, p. 39-48, 1997.
- CHUNG, C.H.; WU, W.B.; HUANG, T.F. Aggretin, a snake venom-derived endothelial integrin $\alpha 2\beta 1$ antagonist, induces angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor. **Boold** v. 103, p. 2105,2112, 2004.
- CLARK, E.A.; TRIKHA, M.; MARKLAND, F.S. Structurally distinct disintegrins contortrostatin and multisquamatin differentially regulate platelet tyrosine phosphorylation. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 21940-21943, 1994.
- COELHO, A.L.J.; DE FREITAS, M. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; MOURA-NETO, V.; ZINGALI, R.B.; BARJA-FIDALGO, C. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeletal dynamics. **Exp. Cell Res.** v. 251, p. 379-387, 1999.
- COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.B.; RAMOS, O.H.P.; FOX, J.W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 18247-18255, 2004.
- COPPOLINO, M.G.; DEDHAR, S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 32, p. 171-188, 2000.
- CRAIG, S.W.; JOHNSON, R.P. Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and potents. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 8, p. 74-85, 1996.
- CROSS, M.J.; DIXELIUS, J.; MATSUMOTO, T.; CLAESSION-WELSH, L. VEGF-receptor signal transduction. **Trends Biochem. Sci.** v. 28, p. 488-494, 2003.

- CURTI, A.; TAFURI, A.; RICCIARDI, M.R.; TAZZARI, P.; PETRUCCI, M.T.; FOGLI, M.; RATTA, M.; LAPALOMBELLA, R.; FERRI, E.; TURA, S.; BACCARANI, M.; LEMOLI, R.M. Interleukin-11 induces proliferation of human T-cells and its activity is associated with downregulation of p27(kip1). **Haematologica** v. 87, p. 373-380, 2002.
- DANEN, E.H.J.; MARCINKIEWICZ, C.; CORNELISSEN, I.M.H.A.; van KRAATS, A.A.; PACHTER, J.A.; RUITER, D.J.; NIEWIAROWSKI, S.; van MUIJEN, G.N.P. The disintegrin ristostatin interferes with integrin $\alpha_4\beta_1$ function and with experimental metastasis of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.** v. 238, p. 188-196, 1998.
- DARDIK, R.; KAUFMANN, Y.; SAVION, N.; ROSENBERG, N.; SHENKMAN, B.; VARON, D. Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: involvement of platelet GP IIb-IIIa and tumor cell alpha v integrins. **Int. J. Cancer** v. 70, p. 201-207, 1997.
- DATTA, G.; DONG, A.; WITT, J.; TU, A.T. Biochemical characterization of basilase, a fibrinolytic enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. **Arch Biochem Biophys.** v. 317, p. 365-373, 1995.
- DATTA, S.R.; BRUNET, A. GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev.** v. 13, p. 2905-2927, 1999.
- DENNIS, M.S.; HENZEL, W.J.; PITTI, R.M. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venom: Evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 87, p. 2471-2475, 1989.
- DESAI, A.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. **Inflammation** v. 24, p. 1-9, 2000.
- DUDEK, H.; DATTA, S.R.; FRANKE, T.F.; BIRNBAUM, M.J.; YAO, R.; COOPER, G.M.; SEGAL, R.A.; KAPLAN, D.R.; GREENBERG, M.E. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. **Science** v. 275, p. 661-665, 1997.
- EVANS, J.P.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins alpha and beta in fertilization. **Biol Reprod.** v. 59, p. 145-152, 1995.

- FERRARA, N.; HENZEL, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 161, p. 851-858, 1989.
- FERRARA, N.; HOUCK, K.; JAKEMAN, L.; LEUNG, D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev.** v. 13, p. 18-32, 1992.
- FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 10931-10934, 1992.
- GALLAGHER, P.S.; BAO, Y.; SERRANO, S.M.T.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G., FOX, J.W. Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. **Toxicon** v. 41, p. 429-440, 2003.
- GASMI, A.; SRAIRI, N.; KAROUI, H.; EL AYEB, M. Amino acid sequence of VIF: identification in the C-terminal domain of residues common to non-hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1481, p. 209-212, 2000a.
- GASMI, A.; ABIDI, F.; SRAIRI, N.; OIJATAYER, A.; KAROUI, H.; EL AYEB, M. Purification and characterization of a growth factor-like which increases capillary permeability from *Vipera lebetina* venom. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 268, p. 69-72, 2000b.
- GASMI, A.; BOURCIER, C.; ALOUI, Z.; SRAIRI, N.; MARCHETTI, S.; GIMOND, C.; WEDGE, S.R.; HENNEQUIN, L.; POUYSSÉGUR, J. Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 29992-29998, 2002.
- GERBER, H.P.; McMURTREY, A.; KOWALSKI, J.; YAN, M.; KEYT, B.A.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 30336-30343, 1998.
- GIANCOTTI, F.G.; ROUSLAHTI, E. Elevated levels of the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor suppresses the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. **Cell.** v. 60, p. 281-290, 1990.

- GILPIN, B.J.; LOECHEL, F.; MATTEI, M.G.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. A novel, secreted form of human ADAM-12 (meltin α) provokes myogenesis in vivo. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 157-166, 1998.
- GOMIS-RÜTH, F.X.; KRESS, L.F.; BODE, W. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. **EMBO J.** v. 12, p. 4151-4157, 1993.
- GOULD, R.J.; POLOKOFF, M.A.; FRIEDMAN, P.A.; HUANG, T.F.; HOLT, J.C.; COOK, J.J.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 195, p. 168-171, 1990.
- GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L.F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Lett.** v. 335, p. 76-80, 1993.
- GREEN, L.J.; MOULD, A.P.; HUMPRIES, M.J. The integrin β subunit. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 30, p. 179-184, 1998.
- HANNIGAN, G.E.; LEUNG-HAGESTEIJN, C.; FITZ-GIBBON, L.; COPPOLINO, M.G.; RADEVA, G.; FILMUS, J.; BELL, J.C.; DEDHAR, S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. **Nature** v. 379, p. 91-96, 1996.
- HARDAN, I.; WEISS, L.; HERSHKOVIZ, R.; GREENSPOON, N.; ALON, R.; CAHALON, L.; REICH, S.; SLAVIN, S.; LIDER, O. Inhibition of metastatic cell colonization in murine lungs and tumor-induced morbidity by non-peptidic Arg-Gly-Asp mimetics. **Int J Cancer** v. 55, p. 1023-1028, 1993.
- HARRIS, A.L. von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. **Oncologist** v. 5, p. 32-36, 2002.
- HAWIGER J, PARKINSON S, TIMMONS S. Prostacyclin inhibits mobilisation of fibrinogen-binding sites on human ADP- and thrombin-treated platelets. *Nature*. 1980 Jan 10;283(5743):195-7. *et al.*, 1980

- HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 38, p. 182-191, 1994.
- HONG, S.Y.; KOH, Y.S.; CHUNG, K.H., KIM. D.S. Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. **Thromb. Res.** v. 105, p. 79-86, 2002.
- HOOPER, N.M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Lett.** v. 354, p. 1-6, 1994.
- HOWE, A.; APLIN, A.E.; ALAHARI, S.K.; JULIANO, R.L. Integrin signaling and cell growth control. **Curr Opin Cell Biol.** v. 10, p. 220-231, 1998.
- HUANG, S.; INGBER, D.E. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. **Nat Cell Biol.** v. 1, p. E 131-138, 1999.
- HUANG, T.F.; HOLT, J.C.; LUKASIEWICZ, H.; NIEWIAROWSKI, S. Trigramin: a low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **J. Biol. Chem.** v. 262, p.16157-16163, 1987.
- HUMPRIES, M.J.; OLDEN, O.; YAMADA, K.M. A synthetic peptide from fibronectina inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. **Science** v. 233, p. 467-470, 1986.
- HUMPRIES, M.J.; McEWAN, P.A.; BARTON, S.J.; BUCKLEY, P.A.; BELLA, J.; MOULD, A.P. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. **Trends Biochem. Sci.** v. 28, p. 313-320, 2003a.
- HYNES, R.O. Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? **Dev Biol.** v. 180, p. 402-412, 1996.
- HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell.** v. 48, p. 549-550, 1987.
- HYNES, R.O. Cell adhesion: old and new questions. **Trends Biochem. Sci.** v. 24, p. M33-M37, 1999.
- HYNES, R.O. Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell.** v. 69, p. 11-25, 1992.

- IMAI, K.; TOSHIKI, N.; HISAYOSHI, S.; OWNBY, C.L. Hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon bilineatus* (common cantil). **Int. J. Biochem.** v. 21, p. 667-673, 1989.
- IVASKA, J.; KAPYLA, J.; PENTIKAINEN, O.; HOFFREN, A.; HERMONENI, J.; HUTTUNEN, P.; JOHNSON, M.S.; HEINO, J. A Peptide Inhibiting the Collagen Binding Function of Integrin $\alpha_2\beta_1$ Domain. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 3513-3521, 1999.
- JAY, P.Y.; PHAM, P.A.; WONG, S.A.; ELSON, E.L. A mechanical function of myosin II in cell motility. **J Cell Sci.** v. 108, p. 387-393, 1995.
- JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASSON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon** v. 34, p. 1269-1276, 1996.
- JIA, L.G.; WANG, X.M.; SHANNON, J.D.; BJARNASSON, J.B.; FOX, J.W. Function of disintegrin-like/cystein-rich domains of atrolysin A. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 13094-13102, 1997.
- JIA, L.G.; WANG, X.M.; SHANNON, J.D.; BJARNASSON, J.B.; FOX, J.W. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cystein-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 373, p. 281-286, 2000.
- JOHNSON, E.K.; OWNBY, C.L. Isolation of a hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Broad-banded copperhead) and pathogenesis of the hemorrhage induced by the toxin in mice. **Int. J. Biochem.** v. 25, p. 267-278, 1993.
- JOHNSON, G.L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science** v. 298, p. 1911-1912, 2002.
- JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.M.; FARSKY, S.H.P.; OLIVEIRA, M.L.S.; HO, P.L. Molecular cloning and expression of functional snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 39836-39842, 2001.
- KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of the cleavage of the $\alpha_2\beta_1$ integrin by the metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.** v. 320, p. 635-641, 1996.

- KAMIGUTI, A.S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUZEL, M.; FOX, J.W. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Lett.** v. 549, p. 129-134, 2003.
- KANG, I.C.; CHUNG, K.H.; LEE, S.J.; YUN, Y.D.; MOON, H.M.; KIM, D.S. (1998) Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake (*Agkistrodon halys brevicaudus*) venom. **Thromb. Res.** v. 91, p. 65-73, 1998.
- KANG, I.C.; LEE, Y.D.; KIM, D.S. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Res.** v. 59, p. 3754-3760, 1999.
- KANG, I.C.; KIM, D.S.; JANG, Y.; CHUNG, K.H. Supressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 275, p. 169-173, 2000.
- KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; EMI, M. Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. **Citogenet. Cell Genet.** v. 68, p. 39-44, 1995.
- KENNEDY, S.G.; WAGNER, A.J.; CONZEN, S.D.; JORDAN, J.; BELLACOSA, A.; TSICHLIS, P.N.; HAY, N. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. **Genes Dev.** v. 11, p. 701-713, 1997.
- KILLAR, L.; WHITE, J.; BLACK, R.; PESCHON, J. Adamalysins – a family of metzincins including TNF- α converting enzyme (TACE). **An. NY Acad. Sci.** v. 878, p. 442-452, 1999.
- KINI, R.M.; EVANS, H.J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon** v. 30, p. 265-293, 1992.
- KLAUS, W.; BROGER, C.; GERBER, P.; SENN, H. Determination of the disulphide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data. Application to flavoridin. **J Mol Biol.** v. 232, p. 897-906, 1993.

- KLEMKE, R.L.; CAI, S.; GIANNINI, A.L.; GALLAGHER, P.J.; DE LANEROLLE, P.; CHERESH, D.A. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. **J Cell Biol.** v. 137, p. 481-492, 1997.
- KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; MASUDA, K.; SUGIHARA, H. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). **Biochem.** v. 38, p. 11796-11803, 1999.
- KRAFT, A.; WEINDEL, K.; OCHS, A.; MARTH, C.; ZMIJA, J.; SCHUMACHER, P.; UNGER, C.; MARME, D.; GASTL, G. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. **Cancer** v. 85, p. 178-187, 1999.
- KRATZSCHMAR, J. LUM, L.; BLOBEL, C.P. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 4593-4596, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAFLAME, S.E.; AUER, K.L. Integrin signaling. **Sem. In Cancer Biol.** v. 7, p. 111-118, 1996.
- LEWIS, J.M.; SCHWATRZ, M.A. Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin $\beta 1$ cytoplasmic domain mutants. **Mol. Biol. Cell** v. 6, p. 151-160, 1995.
- LI, J.; WONG, L. Emerging patterns and gene expression data. **Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.** v. 12, p. 3-13, 2001.
- LIN, T.H.; CHEN, Q.; HOWE, A.; JULIANO, R.L. Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 8849-8852, 1997.
- LIU, C.Z.; PENG, H.C.; HUANG, T.F. Crotavirin, a potent aggregation inhibitor purified from the venom of the snake *Crotalus viridis*. **Toxicon** v. 33, p. 1289-1298, 1995.
- LIU, S.; CALDERWOOD, D.A.; GINSBERG, M.H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. **J. Cell Sci.** v. 113, p. 3563-3571, 2000.

- LO, S.H.; CHEN, L.B. Focal adhesion as a signal transduction organelle. **Cancer Metastas. Rev.** v. 13, p. 9-24, 1994.
- LOECHEL, F.; FOX, J.W.; MURPHY, G.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. ADAM-12S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 278, p. 511-515, 2000.
- LORIA, G.D.; RUCAVADO, A.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; FOX, J.W.; ALAPE, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Characterization of 'basparin A', a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. **Arch. Bioche. Bhiphys.** v. 418, p. 13-24, 2003.
- LLOYD, R.V.; FERREIRO, J.A.; JIN, L.; SEBO, T.J. TGFB, TGFB Receptors, Ki-67, and p27(Kip): Expression in Papillary Thyroid Carcinomas. **Endocr Pathol.** v. 8, p. 293-300, 1997.
- LU, X.; WILLIAMS, J.A.; DEADMAN, J.J.; SALMON, G.P.; KAKKAR, V.V.; WILKINSON, J.M.; BARUCH, D.; AUTHI, K.S.; RAHMAN, S. Preferential antagonism of the interactions of the integrin alpha IIb beta 3 with immobilized glycoprotein ligands by snake venom RGD (Arg-Gly-Asp) proteins: evidence supporting a functional role for the amino acid residues flanking the tripeptide RGD in determining the inhibitory properties of snake-venom RGD proteins. **Biochem. J.** v. 304, p. 929-936, 1994.
- MANNING, M.C. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Agkistrodon contortrix contortrix*. **Toxicon** v. 33, p. 1189-1200, 1995.
- MARC, D.; CLARA, T.; VIRGINIA, G.; LAURENT, R.; JAMES, W.; SHOUKAT, D. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent-regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 95, p. 11211-11216, 1998.
- MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J.J.; VIJAY-KUMAR, S.; MARCINKIEWICZ, M.M.; RAIDA, M.; SHICK, P.; LOBB, R.R.; NIEWIAROWSKI, S. EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom, inhibits α_4 and α_5 integrins in an RGD-independent manner. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 12468-12473, 1999a.

- MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J.J.; VIJAY-KUMAR, S.; MARCINKIEWICZ, M.M.; RAIDÁ, M.; SHICK, P.; LOBB, R.R.; NIEWIAROWSKI, S. Structural and functional characterization of EMF-10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits $\alpha_5\beta_1$ integrin. **Biochem.J.** v. 38, p. 13302-13309, 1999b.
- MARCINKIEWICZ, C.; TAOOKA, Y.; YOKOSAKI, Y.; CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, M.M.; LOBB, R.R.; NIEWIAROWSKI, S.; SHEPPARD, D. Inhibitory effects of MLDG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin alpha 9beta 1 with VCAM-1, tenascin-C, and osteopontin. **J Biol Chem.** v. 275, p. 31930-31937, 2000.
- MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A.L.J.; TERRUGGI, C.H.B.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M.S. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur. J. Biochem.** v. 270, p. 4799-4808, 2003.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon** v. 36, p. 1749-1800, 1998.
- MARKLAND, F.S.; ZHOU, Q. In: Natural and Synthetic Toxins: Biological Implications (eds. TU, A. T. & GAFFIELD, W.) Cap. 18, Amer. Chem. Soc. Washington, DC, 1999.
- MARKLAND, F.S.; SHIEH, K.; ZHOU, Q.; GOLUBKOV, V.; SHERWIN, R.P.; RICHTERS, V.; SPOSTO, R. A novel snake venom disintegrin that inhibits human ovarian cancer dissemination and angiogenesis in an orthotopic nude mouse model. **Haemostasis** v, 31, p. 183-191, 2001.
- MARSH, N.A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism – a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. **Blood Coag. Fibrin.** v. 5, p. 399-410, 1993.
- MATSUI, T.; FUGIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1477, p. 146-156, 2000.

- McLANE, M.A., VIJAY-KUMAR, S. MARCINKIEWICZ, C.; CALVETTE, J.J.; NIEWIAROWSKI, S. Importance of the structure of the RGD-containing loop in the disintegrins echistatin and eristostatin for recognition of α -IIb β 3 and α v β 3 integrins. **FEBS Lett.** v. 391, p. 139-143, 1996.
- McLANE, M.A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATINOWSKI, I; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 219, p. 109-119, 1998.
- MILNER, R.; HUANG, X.; WU, J.; NISHIMURA, S.; PYTELA, R.; SHEPPARD, D.; FRENCH-CONSTANT, C. Distinct roles for astrocyte α v β 5 and α v β 8 integrins in adhesion and migration. **J Cell Sci.** v. 112, p. 4271-4279, 1999.
- MIYAMOTO, S. TERAMOTO, H.; GUTKIND, J.S.; YAMADA, K. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosin kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. **J. Cell Biol.** v. 135, p. 1633-1642, 1996.
- MORO, L. VENTURINO, M.; BOZO, C.; SILENGO, L.; ALTRUDA, F.; BEGUINOT, L.; TARONE, G.; DEFILIPPI, P. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. **EMBO J.** v. 17, p. 6622-6632, 1998.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; MARCINKIEWICZ, C.; MARCINKIEWICZ, M.; NIEWIAROWSKI, S. Selective recognition of α ₂ β ₁ integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Thromb. Res.** v. 102, p. 153-159, 2001.
- MYLES, D.G.; PRIMAKOFF P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. **Biol Reprod.** v. 56, p. 320-327, 1997.
- NATH, D.; SLOCOMBE, P.M.; STEPHENS, P.E.; WARN, A.; HUTCHINSON, G.R.; YAMADA, K.M.; DOCHERTY, A.J.; MURPHY, G. Interaction of metargidina (ADAM 15) with α _v β ₃ and α ₅ β ₁ integrins on different haemopoietic cells. **J. Cell Sci.** v. 112, p. 579-587, 1999.

- NIEWIAROWSKI, S.; McLANE, M.A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G.J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Sem. Hematol.** v. 31, p. 289-300, 1994.
- NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; KOMORI, Y. KATSUYOSHI, M.; FOX, J.W.; SUGIHARA, H. Primary structure and functional characterization of bilitorin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 378, p. 6-15, 2000.
- NOVAK, A.; HSU, S.C.; LEUNG-HAGESTEIJN, C.; RADEVA, G.; PAPKOFF, J.; MONTESANO, R.; ROSKELLEY, C.; GROSSCHEDL, R. DEDHAR, S. Cell adhesion and integrin-linked kinase regulate the lef-1 and β -catenin signaling pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 95, p. 4374-4379, 1998.
- O'DONOVAN, K.J.; TOURTELLOTTE, W.G.; MILBRANDT, J.; BARABAN, J.M. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. **Trend Neurosci.** v. 22, p. 167-173, 1999.
- OKUDA, D.; MORITA T. Purification and characterization of a new RGD/KGD-containing dimeric disintegrin, piscivostatin, from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*: the unique effect of piscivostatin on platelet aggregation. **J Biochem.** v. 130, p. 407-415, 2001.
- OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochem.** v. 41, p. 14248-14254, 2002.
- OSHIKAWA, K.; TERADA, S. Ussuristatin 2, a novel KGD-bearing disintegrin from *Agkistrodon ussuriensis* venom. **J. Biochem.** v. 125, p. 31-35, 1999.
- PAINE, M.J.I.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.G.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high weight metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 22869-22876, 1992.
- PARK, D.; KANG, I.; KIM, H.; CHUNG, K.; KIM, D.S.; YUN, Y. Cloning and characterization of novel disintegrins from *Agkistrodon halys* venom. **Mol. Cells** v. 8, p. 578-584, 1998.

- PEERSCHKE, E.I.; ZUCKER, M.B.; GRANT, R.A.; EGAN, J.J.; JOHNSON, M.M. Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. **Blood** v. 55, p. 841-847, 1980.
- PETRUZZELLI, L.; TAKAMI, M.; HUMES, D. Structure and function of cell adhesion molecules. **Am. J. Med.** v. 106, p. 467-476, 1999.
- PFUFF, M.; McLANE, M.A.; BEVIGLIA, L.; NIEWIAROWSKI, S.; TIMPL, R. Comparison of integrins with limited variation in the RGD loop in their binding to purified integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ in cell adhesion inhibition. **Cell Adhes. Commun.** v. 2, p. 495-501, 1994.
- PHILLIPS, D.R.; CHARO, I.F.; SCARBOROUGH, R.M. GP IIb-IIIa: the responsive integrin. **Cell** v. 65, p. 359-362, 1991.
- PIERCE, E.A.; FOLEY, E.D.; SMITH, L.E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. **Arch Ophthalmol.** v. 114, p. 1219-1228, 1996.
- PLOW, E.F.; HAAS, T.A.; ZHANG, L.; LOFTUS, J.; SMITH, J.W. Ligand binding to integrins. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 21785-21788, 2000.
- PRIMAKOFF, P.; HYATT, H.; TREDICK-KLINE, J. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-membrane fusion. **J. Cell Biol.** v. 104, p. 141-149, 1987.
- PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. The ADAM gene family-surface proteins with adhesion and protease activity. **Trens Genetic.** v. 16, p. 82-87, 2000.
- RAMEH, L.E.; CANTLEY, L.C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. **J Biol Chem.** v. 274, p. 8347-8350, 1999.
- RAMOS & SELISTRE-DE-ARAUJO, Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools. **Toxicon in press**, 2004.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. In: *Methods in Enzymology* (ed. BARRETT, A. J.) vol. 248, part. E. Academic Press. San Diego, CA, 1995.
- RITTER, M.R.; ZHOU, Q.; MARKLAND, F.S. JR. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, induces $\alpha_v\beta_3$ -mediated tyrosine phosphorylation of CAS and FAK in tumor cells. **J Cell Biochem.** v. 79, p. 28-37, 2000.

- ROCHA E SILVA M. Pharmacology of venoms-introductory remarks. **Mem Inst Butantan** v. 33, p. 457-460, 1966.
- ROMBERGER, D.J. Fibronectin. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 29, p. 939-943, 1997.
- RUOSLAHTI, E.; GIANCOTTI, F. Integrins and tumor cell dissemination. **Cancer cells** v. 1, p. 119-128, 1989.
- SCARBOROUGH, R.M. NAUGHTON, M.A.; TENG, W.; ROSE, J.W.; PHILLIPS, D.R.; NANNIZZI, L.; ARFSTEN, A.; CAMPBELL, A.M.; CHARO, I.F. Design of potent and specific integrin antagonists: peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 1066-1073, 1993.
- SCARBOROUGH, R.M.; ROSE, J.W.; HSU, M.A.; PHILLIPS, D.R.; FRIED, V.A.; CAMPBELL, A.M.; NANNIZZI, L.; CHARO, I.F. Barbourin, A GPIIb-IIIa specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 9359-9362, 1991.
- SCHALLER, M.D.; PARSONS, J.T. Focal adhesion kinase and associated proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 6, p. 705-710, 1994.
- SCHLAEPFER, D.D.; HANKS, S.K.; HUNTER, T.; van der GEER, P. Integrin-mediated signal transduction linked to ras pathway by GRB2 binding to the focal adhesion kinase. **Nature** v.372, p. 786-791, 1997.
- SCHWARTZ, M.A. Integrin signaling revisited. **Trends Cell Biol.** v. 11, p. 466-470, 2001.
- SCHWARTZ, M.A.; BARON, V. Interactions between mitogênico stimuli, or, a thousand and one connections. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 11, p. 197-202, 1999.
- SCHWARTZ, M.A.; SCHALLER, M.D.; GINSBERG, M.H. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 11, p. 549-599, 1995.
- SEEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Gen. Dev.** v. 17, p. 7-30, 2003.

- SELISTRE-DE-ARAUJO H.S.; OWNBY, C.L. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs for metalloproteinases from broad-banded copperhead *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Arch Biochem Biophys.** v. 320, p. 141-148, 1995.
- SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; PERRUZZI, C.A.; HARVEY, V.S.; DVORAK, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science** v. 219, p. 983-985, 1983.
- SENGER, D.R.; CONNOLLY, D.T.; van de WATER, L.; FEDER, J.; DVORAK, H.F. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. **Cancer Res.** v. 50, p. 1774-1778, 1990.
- SENGER, D.R. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor: multiple biological activities for promoting angiogenesis. In: Tumor Angiogenesis and Microcirculation. Ed. E.E. Voest, PA D'Amore. Nova York, Marcel Dekker Inc., p. 167-184, 2001.
- SCHADT, E.E.; LI, C.; ELLIS, B.; WONG, W.H. Feature extraction and normalization algorithms for high-density oligonucleotide gene expression array data. **J Cell Biochem.** supl. 37, p. 120-125, 2001.
- SHAH, N.K.; REJTO, P.A.; VERKHIVKER, G.M. Structural consensus in ligand-protein docking identifies recognition peptide motifs that bind streptavidin. **Proteins** v. 28, p. 421-433, 1997.
- SHEU, J.R.; LIN, C.H.; PENG, H.C.; HUANG, T.F. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide, inhibits human cervical carcinoma (HeLa) cell-substratum adhesion through an RGD-dependent mechanism. **Peptides.** v. 15, p. 1391-1398, 1994.
- SHIMOKAWA, K.; TAKAHASHI, H. Comparative study of fibrinogen degradation by four arginine ester hydrolases from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-Mamushi). **Toxicon** v. 33, p. 179-186, 1995.
- SHIMOKAWA, K.; SHANNON, J.D.; JIA, L.G.; FOX, J.W. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cystein-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Arch. Biochim. Biophys.** v. 343, p. 35-43, 1997.

- SHIMOKAWA, K.; JIA, L.G.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W. Isolation, sequence analysis, and biological activity of atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. **Arch Biochem Biophys.** v. 354, p. 239-246, 1998.
- SIIGUR, E.; AASPOLLU, A.; TU, A.T.; SIIGUR, J. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of fibrinolytic enzyme (lebetase) from *Vipera lebetina* snake venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 224, p. 229-236, 1996.
- SIIGUR, J.; SAMEL, M.; TONISMAGI, K.; SUBBI, J.; SIIGUR, E.; TU, A.T. Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* snake venom. **Thromb Res.** v. 90, p. 39-49, 1998.
- SIIGUR, E.; SIIGUR, G. Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Viper lebetina* (snake) venom. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1074, p. 223-229, 1991.
- SMILENOV, L.; FORSBERG, E.; ZELIGMAN, I.; SPARRMAN, M.; JOHANSSON, S. Separation of fibronectin from a plasma gelatinase using immobilized metal affinity chromatography. **FEBS Lett.** v. 302, p. 227-230, 1992.
- SMITH, J.B.; THEAKSTON, R.D.G.; COELHO, A.C.; BARJA-FIDALGO, C.; CALVETTE, J.J.; MARCINKIEWICZ, C. Characterization of a monomeric disintegrin, ocellatusin, present in the venom of the Nigerian carpet viper, *Echis ocellatus*. **FEBS Lett.** v. 512, p. 111-115.
- SOSZKA, T.; KNUDSEN, K.A.; BEVIGLIA, L.; ROSSI, C.; POGGI, A.; NIEWIAROWSKI, S. Inhibition of murine melanoma cell-matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*. **Exp. Cell Res.** v. 196, p. 6-12, 1991.
- SOUZA, D.H.F.; IEMMA, M.R.C.; FERREIRA, L.L.; FARIA, J.P.; OLIVA, M.L.V.; ZINGALI, R.B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 384, p. 341-350, 2000.
- SPRINGER, T.A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature** v. 346, p. 425-434, 1990.

- SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell** v. 76, p. 301-314, 1994.
- SRIRAMARAO, P.; STEFFNER, K.R.; GEHLSON, K.R. Biochemical evidence for a homophilic interaction of the $\alpha_3\beta_1$ integrin. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 22036-22041, 1993.
- STONE, A.L.; KROEGER, M.; SANG, Q.X. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. **J. Protein Chem.** v. 18, p. 447-465, 1999.
- SYMINGTON, B.E.; TAKADA, Y.; CARTE, W.G. Interaction of integrins $\alpha_3\beta_1$ and potential role keratinocyte intercellular adhesion. **J. Cell Biol.** v. 120, p. 523-535, 1993.
- TAKEYA, H.; ARAKAWA, M.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; OMORI-SATOH, T. Primary structure of H2-proteinase, a non-hemorrhagic metalloproteinase, isolated from the venom of the habu snake, *Trimeresurus flavoviridis*. **J Biochem.** v. 106, p. 151-157, 1989.
- TAKEYA, H.; ODA, K.; MIYATA, T.; OMORI-SATOH, T.; IWANAGA, S. The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J Biol Chem.** v. 265, p. 16068-16073, 1990.
- TAOOKA, Y.; CHEN, J.; YEDNOCK, T.; SHEPPARD, D. The integrin $\alpha_9\beta_1$ mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. **J Cell Biol.** v. 145, p. 413-420, 1999.
- TARIN, D. Clinical and experimental studies on the biology of metastasis. **Biochim Biophys Acta** v. 780, p. 227-235, 1985.
- TERADA, S.; HORI, J.; FUJIMURA, S.; KIMOTO, E. Purification and amino acid sequence of brevilysin L6, a non-hemorrhagic metalloprotease from *Agkistrodon halys brevicaudus* venom. **J Biochem.** v. 125, p. 64-69, 1999.
- TRIKHA, M.; De CLERCK, Y.A.; MARKLAND, F.S. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits β_1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. **Cancer Res.** v. 54, p. 4993-4998, 1994a.

- TRIKHA, M.; ROTE, W.; MANLEY, P.; LUCCHESI, B.R.; MARKLAND, F.S. Purification and characterization of platelet aggregation inhibitors from snake venoms. **Thromb. Res.** v. 73, p. 39-52, 1994b.
- TSAI, I.H.; WANG, Y.M.; CHIANG, T.Y.; CHEN, Y.L.; HUANG, R.J. Purification, cloning and sequence analyses for pro-metalloprotease-disintegrin variants from *Deinagkistrodon acutus* venom and subclassification of the small venom metalloproteases. **Eur J Biochem.** v. 267, p. 1359-1367, 2000.
- USAMI, Y.; FUGIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIKA, A.; HIRANO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K. A 28kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem. Res. Commun.** v. 201, p. 331-339, 1994.
- van WAES, C. Cell adhesion and regulatory molecules involved in tumor formation, hemostasis, and wound healing. **Head Neck** v. 17, p. 140-147, 1995.
- VUENTO, M.; VAHERI, A. Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. **Biochem J.** v. 183, p. 331-337, 1979.
- VUENTO, M.; WRANN, M.; RUOSLAHTI, E. Similarity of fibronectins isolated from human plasma and spent fibroblast culture medium. **FEBS Lett.** v. 82, p. 227-231, 1977.
- VUORI, K.; HIRAI, H.; AIZAWA, S. RUOSLAHTI, E. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. **Mol. Cell. Biol.** v. 16, p. 2606-2613, 1996.
- WAGNER, G.; WYSS, D.F. Cell surface adhesion receptors. **Curr. Op. Struc. Biol.** v. 4, p. 841-851, 1994.
- WILLIAMS, M.J.; HUGHES, P.E.; O'TOOLE, T.E.; GINSBERG, M.H. The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. **Trends Cell Biol.** v. 4, p. 109-112, 1994.
- WILLIS, T.W.; TU, A.T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. **Biochemistry** v. 27, p. 4769-4777, 1988.

- WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J Cell Biol.** v. 131, p. 275-278, 1995.
- WOLFSBERG, T.G.; WHITE, J.M. ADAMs in fertilization and development. **Dev. Biol.** v. 180, p. 389-401, 1996.
- YAMADA, K. Adhesive Recognition Sequences. **J.Biol. Chem.** v. 266, p. 12809-12812, 1991.
- YAMADA, D.; SHIN, Y.; MORITA, T. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of disintegrin flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **FEBS Lett.** v. 451, p. 299-302, 1999.
- YAMADA, D.; SEKIYA, F.; MORITA, T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 5200-5207, 1996.
- YAMADA, K.M.; MIYAMOTO, S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 7, p. 681-689, 1995.
- YAMAZAKI, Y.; TAKANI, K.; ATODA, H.; MORITA, T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 51985-51988, 2003.
- ZENG, X.R.; SUN, Y.; WENGER, L.; CHEUNG, H.S. Induction of early growth response gene Egr2 by basic calcium phosphate crystals through a calcium-dependent protein kinase C-independent p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway. **Cells Tissues Organs** v. 174, p. 63-72, 2003.
- ZHANG, X.P.; KAMATA, T.; YOKOYAMA, K.; PUZON-McLAUGHLIN, W.; TAKADA, Y. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain MDC-15 (etargidin, ADAM 15) with integrin $\alpha v \beta 3$. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 7345-7350, 1998.
- ZHOU, Q.; SMITH, J.B.; GROSSMAN, M.H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochem. J.** v. 307, p. 411-417, 1995.

- ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C. SMITH, J.B. The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 219, p. 720-726, 1996.
- ZHOU, Q.; NAKADA, M.T.; BROOKS, P.C.; SWENSON, S.D.; RITTER, M.R.; ARGOUNOVA, S.; ARNOLD, C.; MARKLAND, F.S. Contortrostatin, a homodimeric disintegrin, binds to integrin $\alpha_v\beta_5$. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 267, p. 350-355, 2000a.
- ZHOU, Q.; HU, P.; RITTER, M.R.; SWENSON, S.D.; ARGOUNOVA, S.; EPSTEIN, A.L.; MARKLAND, F.S. Molecular cloning and functional expression of contortrostatin, a homodimeric disintegrin from southern copperhead snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 375, p. 278-288, 2000b.
- ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A.S.; EBLE, J. DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J.W.; MAUCH, C. The reprotysin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 40528-40535, 2002.

ANEXOS



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Archives of Biochemistry and Biophysics 416 (2003) 171–179

ABB

www.elsevier.com/locate/yabbi

BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with $\alpha_5\beta_1$ integrin

M.R. Cominetti,^a J.U. Ribeiro,^a J.W. Fox,^b and H.S. Selistre-de-Araujo^{a,*}

^a Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

^b Department of Microbiology, University of Virginia Health System, Charlottesville, VA, USA

Received 11 March 2003, and in revised form 6 June 2003

Abstract

The $\alpha_5\beta_1$ integrin is one of the major fibronectin receptors which plays an essential role in the adhesion of normal and tumor cells to extracellular matrix. Here, we describe the isolation and characterization of a novel dimeric metalloproteinase/disintegrin, which is an inhibitor of fibronectin binding to the $\alpha_5\beta_1$ integrin. This protein (BaG) was isolated from the venom of the South American snake *Bothrops alternatus* by gelatin–Sepharose affinity and anion exchange chromatography. The molecular mass of BaG was approximately 130 kDa under non-reducing conditions and 55 kDa under reducing conditions by SDS–PAGE. BaG shows proteolytic activity on casein that was inhibited by EDTA. 1,10-phenanthroline-treated BaG (BaG-I) inhibits ADP-induced platelet aggregation with an IC_{50} of 190 nM. BaG-I inhibits fibronectin-mediated K562 cell adhesion with an IC_{50} of 3.75 μ M. K562 cells bind to BaG-I probably through interaction with $\alpha_5\beta_1$ integrin, since anti- $\alpha_5\beta_1$ antibodies inhibited K562 cell adhesion to BaG-I. In addition, BaG-I induces the detachment of K562 cells that were bound to fibronectin. In summary, we have purified a novel, dimeric snake venom metalloproteinase/disintegrin that binds to the $\alpha_5\beta_1$ integrin.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Metalloproteinase; Disintegrin; Snake venom; Cell adhesion; Fibronectin; $\alpha_5\beta_1$ integrin

Venoms from snakes belonging to the families *Crotalidae* and *Viperidae* contain many metalloproteinases, which are members of the Reprolysin superfamily of metalloproteinases [1,2]. These metalloproteinases can cause severe bleeding in envenomated animals by interfering with the blood coagulation system and hemostatic plug formation and/or by degrading the basement membrane or extracellular matrix (ECM)¹ components

of the victims [3]. Snake venom metalloproteinases (SVMPs) are zinc-metalloproteinases with a Zn^{2-} -binding motif (HEXXHXXGXXH) and chelation of the Zn^{2-} ion with EDTA or 1,10-phenanthroline completely abolishes their proteolytic and hemorrhagic activities [1].

SVMPs are synthesized in the venom gland as large multidomain proteins, including a proenzyme domain and a highly conserved zinc-protease domain. These proteinases are zymogens, which are subsequently processed to the active form. SVMPs have been classified into four basic structural classes (P-I to P-IV) according to their molecular mass and domain organization [1]. All four groups share homologous signal peptide, proenzyme domain, and a proteinase domain. The major structural differences between these classes are the result of additional carboxy-terminal domains following the proteinase domain. The mature proteins of class P-I have only a hemorrhagic or non-hemorrhagic metalloproteinase domain and include the small SVMPs of about 24.000 Da, such as atrolysin B, Cc, and Cb [4]. The P-II class has both metalloproteinase domain and

* Corresponding author. Fax: +55-16-260-8327.

E-mail address: hsaraujo@power.ufscar.br (H.S. Selistre-de-Araujo).

¹ Abbreviations used: SVMP, snake venom metalloproteinase; ECM, extracellular matrix; RGD, arginine–glycine–aspartic acid; BSA, bovine serum albumin; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; SDS–PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; EDTA, ethylenediaminetetracetic acid; ATCC, American Type Tissue Culture Collection; FBS, fetal bovine serum; BaG-I, 1,10-phenanthroline-treated BaG; ADAM, a disintegrin and metalloprotease; Hepes, (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]); LC–MS–MS, liquid chromatography–mass spectrometry–mass spectrometry.

disintegrin domain carboxyl to the proteinase domain. Atrolysin E and Bilitoxin-I are examples of a P-II class protein [4]. P-III proteins have a proteinase domain, a disintegrin-like domain, and an additional domain, the cysteine-rich. The disintegrin-like domain of P-III proteins may have an D/ECD sequence which interacts with $\alpha_2\beta_1$ integrin such as in alternagin [5] and jararhagin [6]. The P-IV proteins have an additional domain, with a lectin structure [1].

Homologous membrane-bound proteins with multi-modular structure are found in mammalian tissues, in which they seem to play important roles in several physiological processes including fertilization, cell differentiation, and shedding of receptors [7–11]. These proteins are named ADAMs (for *a* disintegrin and metalloproteinase). Today, about 30 ADAMs have been found in a variety of species such as *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, and mammals such as mice and humans [12–14].

Disintegrins are derived from proteolytic processing of the P-II or P-III proteins [15] and interact with integrin receptors on the surface of cells [16–18]. Integrins are heterodimeric transmembrane proteins, which connect the ECM components and the cell cytoskeleton [19,20]. Cell adhesion to the ECM is partially mediated by binding of integrin to an integrin-recognition RGD motif found in some ECM components such as fibronectin, vitronectin, and fibrinogen [21]. Most disintegrins are very potent inhibitors of platelet aggregation by acting as antagonists of the fibrinogen binding to platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin receptor due to a cell-adhesive RGD motif in their amino acid sequence [22,23]. Some disintegrins bind to integrins and activate intracellular signaling events such as a phosphorylation cascade [24,25] and up-regulation of matrix metalloprotease and integrin genes [26].

Disintegrins are found either in monomeric and homo- or hetero-dimers. Few dimeric disintegrins have been isolated and binding to distinct integrins has been attributed to the dimeric nature of these molecules [27–32].

In spite of the recent characterization and biological activity of dimeric disintegrins, very little is known about the precursor forms for these molecules [33]. Recently, Okuda et al. [34] described a cDNA coding for a new precursor form of a snake venom disintegrin, which lacks both pro-enzyme and catalytic metalloprotease domains. It was suggested that dimerization would occur after translation and one subunit of a dimeric disintegrin could form a dimer with a processed disintegrin from a P-II or a P-III SVMP. Therefore, the isolation of new disintegrins and/or the precursor forms from snake venoms, which are relatively rich sources of these proteins, will provide new tools for the understanding of the structural features of disintegrins as well as for the studies of cell adhesion. Here, we report the

isolation and biological activity of BaG, a new metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops alternatus* venom that interacts with $\alpha_5\beta_1$ integrin, a fibronectin receptor. This is the first report of a dimeric SVMP isolated from the genus *Bothrops*.

Materials and methods

The venom of *B. alternatus* was kindly provided by the venom commission of Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. Gelatin–Sephacrose 4B and DEAE–Sephacrose Fast Flow were from Pharmacia (Sweden). Anti-rabbit IgG, alkaline phosphatase conjugate, and bovine serum albumin were from Sigma (USA). Molecular mass standards, fibronectin, fetal bovine serum, and all culture reagents were purchased from Gibco-BRL (USA). Casein was from Calbiochem (USA). Anti- $\alpha_5\beta_1$ and anti-echistatin antibodies were provided by Dr. Stefan Niewiarowski (Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA). Anti- β_1 , anti- α_v , and anti- β_3 antibodies were kindly provided by Dr. Christina Barja-Fidalgo (Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ, Brazil). All other chemicals were of the highest grade available.

Cell lines

K562 cells from human erythroleukemia were purchased from ATCC (USA). K562 cells transfected with $\alpha_2\beta_1$ integrin were a gift from Dr. M.E. Hemler (Dana Farber, Boston, MA). Cells were stably transfected and the expression of integrins was confirmed by flow cytometry using monoclonal antibodies against the α_2 integrin subunit (clone AK-2, Pharmingen, USA).

Protein purification

Gelatin–Sephacrose 4B affinity chromatography

Bothrops alternatus crude venom (50 mg) was applied to a gelatin–Sephacrose 4B column (1.0 × 4.0 cm), previously equilibrated with 10 mM Tris–HCl, pH 8.6. Elution was carried out using the same buffer plus 1.5 M NaCl at a flow rate of 1 ml/min and the fractions were tested for enzymatic activity in the presence or absence of EDTA. The eluted fractions were pooled and applied to a DEAE–Sephacrose column.

DEAE–Sephacrose fast flow anion exchange chromatography

Fractions eluted from gelatin–Sephacrose were separated further on a DEAE–Sephacrose column (1.5 cm × 10 cm), previously equilibrated with 10 mM Tris–HCl, pH 8.6, and bound proteins were eluted with a NaCl gradient (0–1 M), at a flow rate of 2.5 ml/min. All purification steps were performed at 4 °C.

Proteolytic activity assays

All chromatographic steps were followed by proteolytic assays of the eluted fractions using casein as substrate. Briefly, 25 μ l of the fractions to be tested was mixed with 0.5 ml of 0.5% casein in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8.6) containing 100 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, or 15 mM EDTA for inhibition assays. After incubation for 1 h at 37 °C, the reaction was stopped by adding 0.5 ml of 15% trichloroacetic acid. The solution was centrifuged at 13,000g for 10 min and the absorbance of the supernatant was measured at 280 nm to determine the released peptides.

Minimum hemorrhagic dose (MHD)

Hemorrhagic activity was determined in mice as previously described [35]. Briefly, mice were injected intradermally with different doses (one dose per mouse) of the purified protein. Two hours after injection, animals were killed, their skins were removed, and the diameters of the hemorrhagic spots were measured. The minimum hemorrhagic dose was defined as the amount of protein that produces a halo of 1 cm, 2 h after injection.

Protein characterization

Protein purification was followed by SDS–PAGE [36] and Western blot analysis. The primary antibody was produced in rabbits against an RGD-disintegrin echistatin [37]. Antibodies against a non-RGD-disintegrin (alternagin-C) were also used as previously described [5]. The molecular mass of purified protein was estimated by SDS–PAGE. Protein concentration was determined using Coomassie brilliant blue G-250 according to the method of Bradford [38].

Mass spectrometry analysis

Protein solution sample (10 μ g in PBS) was digested using 1 μ g sequencing grade modified trypsin. Digestion was allowed to proceed overnight at room temperature. Sample was acidified with 20 μ l of 1% acetic acid just prior analysis by LC–MS–MS system (Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer) in a nanospray configuration. Sample was injected and the peptides were eluted from the column by an acetonitrile/0.1 M acetic acid gradient at a flow rate of 0.25 μ l/min. The nanospray ion source was operated at 2.8 kV. The digest was analyzed using the double play capability of the instrument acquiring full scan mass spectra to determine peptide molecular weights and product ion spectra to determine the amino acid sequence in sequential scans. The data were analyzed by database searching using the Sequest search algorithm for identification of the source protein.

Platelet aggregation assays

For platelet and adhesion assays, the purified protein was treated with 1,10-phenanthroline in order to avoid a proteolytic effect on the studied cells. Protein solution (0.2 mg/ml) was incubated at 4 °C with 1,10-phenanthroline for 24 h and then dialyzed against 50 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0, to remove the excess of inhibitor.

Platelet aggregation assays were performed in human platelet-rich plasma (PRP). Human blood was obtained from healthy donors and an 8% sodium citrate solution was added into the blood at the proportion of 1/9 (v/v). The mixture was centrifuged at 500g for 10 min and PRP was transferred into a clean tube. The concentration of platelets used in each assay was adjusted to 2×10^5 cells/0.5 ml. Different amounts of purified protein were added to PRP and allowed to incubate for 2 min, followed by the addition of ADP (final concentration of 10 μ M) to initiate aggregation. Platelet aggregation was measured in a Chronolog Aggregometer at 37 °C with stirring (900 rpm). The maximum aggregation response obtained from addition of ADP and in the absence of the tested protein was given a value of 100% aggregation. The IC₅₀ value was determined from a dose-dependence curve.

Adhesion assays

Inhibition of adhesion

All cells were cultured in DMEM containing 10% FBS, L-glutamine, streptomycin, and geneticin for transfected cells at 37 °C in a water-jacketed CO₂ incubator. Adhesion of cells labeled with 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) was performed as described previously [28]. Briefly, ligands, fibronectin (1 μ g/well) or collagen type I (0.5 μ g/well) were immobilized on a 96-well microtiter plate (Falcon, Pittsburgh, PA) in HEPES buffer plus 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 1 mM MnCl₂ (adhesion buffer) overnight at 4 °C. For negative control of adhesion, 1% bovine serum albumin (BSA) solution was used. Wells were blocked with 1% BSA in adhesion buffer. Cells (5×10^6 /ml) were labeled by incubation with 12.5 μ M of 5-chloromethylfluorescein diacetate in adhesion buffer at 37 °C for 30 min. Unbound label was removed by washing with the same buffer. Labeled cells were incubated with 1,10-phenanthroline-treated purified protein (4 μ M/well) before being transferred to the plate (1×10^5 cells/well) and incubated at 37 °C for 30 min. After washing to remove unbound cells, the remaining cells were lysed by the addition of 0.5% Triton X-100. In parallel, a standard curve was prepared in the same plate using known concentrations of labeled cells. The plates were read using a Spectra-Max Gemini XS fluorescence plate reader (Molecular

Devices, Sunnyvale, CA) with 485-nm excitation and 530-nm emission filters.

Adhesion promotion and antibody competition assays

For adhesion assays, 1,10-phenanthroline-treated purified proteins (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) were immobilized on a 96-well microtiter plate in adhesion buffer overnight at 4°C. Labeled cells (1×10^5 cells/well) alone or previously incubated with anti- $\alpha_5\beta_1$, anti- β_1 , anti- α_v , or anti- β_3 antibodies were added to the wells for 30 min at 37°C. After washing with adhesion buffer to remove unbound cells, the remaining cells were lysed and the plate was read as described above.

Detachment assays

For detachment assays, fibronectin (1 $\mu\text{g}/\text{well}$) was immobilized on a 96-microtiter well plate in adhesion buffer overnight at 4°C. Labeled cells (1×10^5 cells/well) were allowed to adhere for 30 min at 37°C and next the 1,10-phenanthroline-treated protein (4 $\mu\text{M}/\text{well}$) was added. After washing with adhesion buffer to remove unbound cells, the remaining cells were lysed and the plate was read as described above. The negative control of adhesion was made with BSA (1%).

Statistical analysis of data

Each experiment was repeated three times in triplicate and a mean and a standard error mean was calculated. The results were compared statistically with a two-way analysis of variance (ANOVA). Since the ANOVA tests showed significant differences (acceptable p level < 0.05) Duncan's significant difference post hoc analysis was performed to determine differences between simple main-effect means.

Results

Purification and sequence analysis of BaG

Bothrops alternatus crude venom was applied in a gelatin–Sephacryl 4B affinity column (Fig. 1A) and fractions were tested for proteolytic activity using casein in the presence or absence of EDTA. Selected fractions with proteolytic activity and within the expected size in SDS–PAGE were pooled and applied to a DEAE–Sephacryl anion exchange column. BaG was eluted by the NaCl gradient and its proteolytic activity on casein was inhibited by EDTA, suggesting that BaG was a metalloprotease (Fig. 1B). However, BaG did not induce any hemorrhage at doses up to 10 μg .

SDS–PAGE analysis of purified BaG showed a molecular mass of approximately 130 kDa under non-reducing conditions and 55 kDa under reducing conditions (Fig. 2A). We estimated that BaG represents at least 0.2% of the total protein in the venom, since 0.1 mg of BaG was isolated from 50 mg of *B. alternatus* crude venom. Only the non-reduced protein strongly reacts with antibodies against the RGD-disintegrin echistatin (Fig. 2B). Reduction of BaG resulted in the loss of its ability to react with these antibodies, suggesting a conformational-dependent binding of antibodies.

N-terminal sequencing of unreduced BaG showed that it is blocked which is common for many P-III SVMPs. The sequence of some internal peptides of BaG was obtained by LC–MS–MS as shown in Fig. 3. Sequence comparison of these fragments showed that BaG has homology to the P-III group of snake venom metalloproteinases such as a metalloproteinase from *Gloydius halys* [39], atrolysin A from *Crotalus atrox* [40],

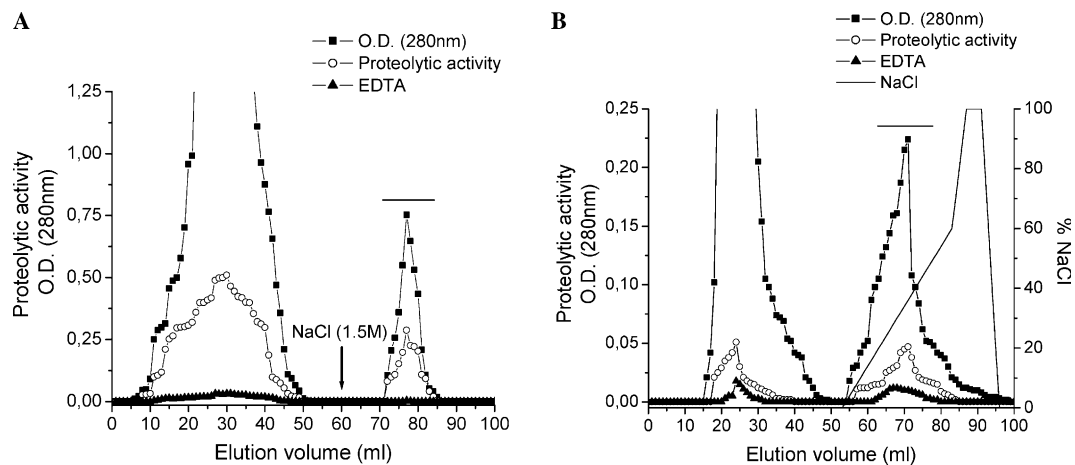


Fig. 1. Purification of BaG. (A) *Bothrops alternatus* crude venom was applied to a gelatin–Sephacryl column equilibrated with 10 mM Tris–HCl at a flow rate of 1 ml/min and eluted fractions (NaCl 1.5M) were tested for proteolytic activity against casein (0.5%) in the presence of CaCl_2 (open circles) or EDTA (up triangles). (B) Gelatin–Sephacryl selected fractions were applied further to a DEAE–Sephacryl Fast Flow anion exchange column at a flow rate of 2.5 ml/min in a linear gradient of NaCl (0–1M). Bars represent fractions of interest.

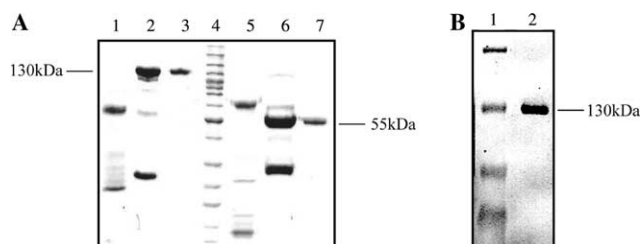


Fig. 2. Analysis of purified BaG. (A) SDS-PAGE in a Coomassie brilliant blue-stained 12% gel. Lane 1, crude venom (under non-reducing conditions); lane 2, gelatin-Sepharose eluted fraction (non-reduced); lane 3, DEAE-Sepharose eluted fraction (purified BaG, non-reduced); lane 4, Molecular mass standards (Bench Mark Protein Ladder—Gibco); lane 5, crude venom (under reducing conditions with 0.1M β -mercaptoethanol); lane 6, gelatin-Sepharose eluted fraction (reduced); and lane 7, DEAE-Sepharose eluted fraction (purified BaG, reduced). (B) Western blotting analysis. Samples were transferred from a 7.5% SDS-PAGE gel to a nitrocellulose membrane and probed with anti-echistatin serum (1:1000). Lane 1, pre-stained molecular mass standards (Bench Mark Protein Ladder—Gibco) and lane 2, non-reduced BaG.

jararhagin and bothropasin from *B. jararaca* [41,42], and ACLD from *Agkistrodon contortrix laticinctus* [43]. Four peptides (P1–P4) correspond to the internal sequence of the metalloprotease catalytic domain, and P5 is identical to the one found in the cystein-rich domain of PIII-class of SVMP (Fig. 3). These results suggest that BaG belongs to this class of SVMPs.

Platelet aggregation and adhesion studies

For platelet and adhesion assays, BaG was treated with 1,10-phenanthroline in order to discard a proteolytic effect on the studied cells. In this case, the protein was named BaG-I (for inhibited). No toxic effects of 1,10-phenanthroline in the biological assays were observed and the inhibition of BaG by 1,10-phenanthroline was irreversible.

BaG-I inhibited ADP-induced platelet aggregation in PRP and this effect was dependent on concentration

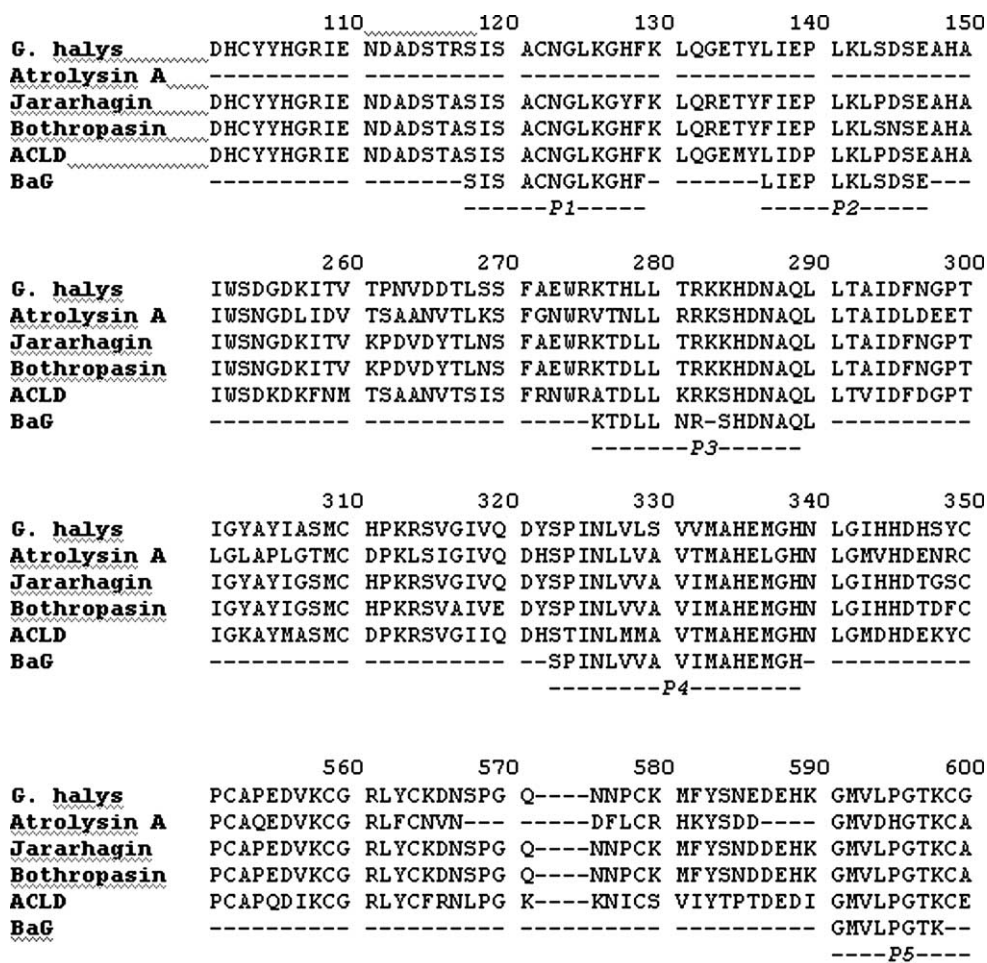


Fig. 3. Comparison of the partial amino acid sequence of BaG with those of other svMPs. *G. halys*, metalloproteinase from *Gloydus halys* [39], atrolysin A, from *Crotalus atrox* [40], jararhagin [41] and bothropasin, from *B. jararaca* [42], and ACLD, from *Agkistrodon contortrix laticinctus* [43]. Gaps were inserted to obtain maximum degrees of similarity. Numbers on the top indicate the residue number in proteins. P1–P5 and BaG tryptic peptides determined by LC–MS–MS.

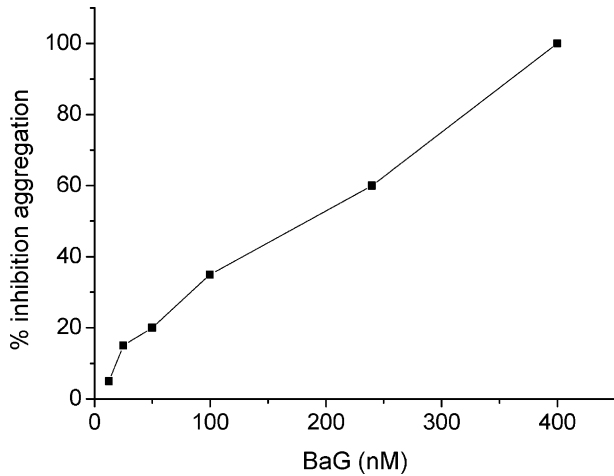


Fig. 4. Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by BaG-I. It was done in platelet-rich plasma (2×10^5 platelets/0.5 ml) incubated 2 min at 37°C with the indicated concentrations of 1,10-phenanthroline-treated BaG. ADP concentration was $10 \mu\text{M}$. The maximum aggregation response obtained from addition of ADP and in the absence of BaG-I was given a value of 100% aggregation. The IC_{50} value determined from the curve is 190 nM.

(Fig. 4). The IC_{50} of 1,10-phenanthroline-treated BaG was 190 nM, thus suggesting that the disintegrin domain was primarily responsible for this activity.

BaG-I significantly inhibited the adhesion of K562 cells to fibronectin (Fig. 5A) with an IC_{50} of $3.75 \mu\text{M}$, whereas it had no effect on the adhesion of K562 $\alpha_2\beta_1$ -transfected cells to collagen type I (Fig. 5B). These results suggest that BaG specifically binds to the $\alpha_5\beta_1$ integrin and competes with the RGD sequence on fibronectin. Since RGD-containing proteins and peptides have been shown to promote cell adhesion, we tested the ability of immobilized BaG-I to mediate K562 cell adhesion. Wells were coated with the purified protein and then incubated with K562 cells. When immobilized on wells, BaG-I ($10 \mu\text{g}/\text{well}$) induced significant adhesion of K562 cells (Fig. 5C) but not of K562- $\alpha_2\beta_1$ -transfected cells (Fig. 5D).

To test whether BaG-I binds to $\alpha_5\beta_1$ integrin, assays were performed by prior incubation of K562 cells with anti- $\alpha_5\beta_1$, anti- β_1 , anti- α_v , and anti- β_3 antibodies. The attachment of K562 cells to immobilized BaG-I ($10 \mu\text{g}/\text{well}$) was significantly inhibited by anti- $\alpha_5\beta_1$ integrin antibodies, whereas anti- α_v and anti- β_3 antibodies had

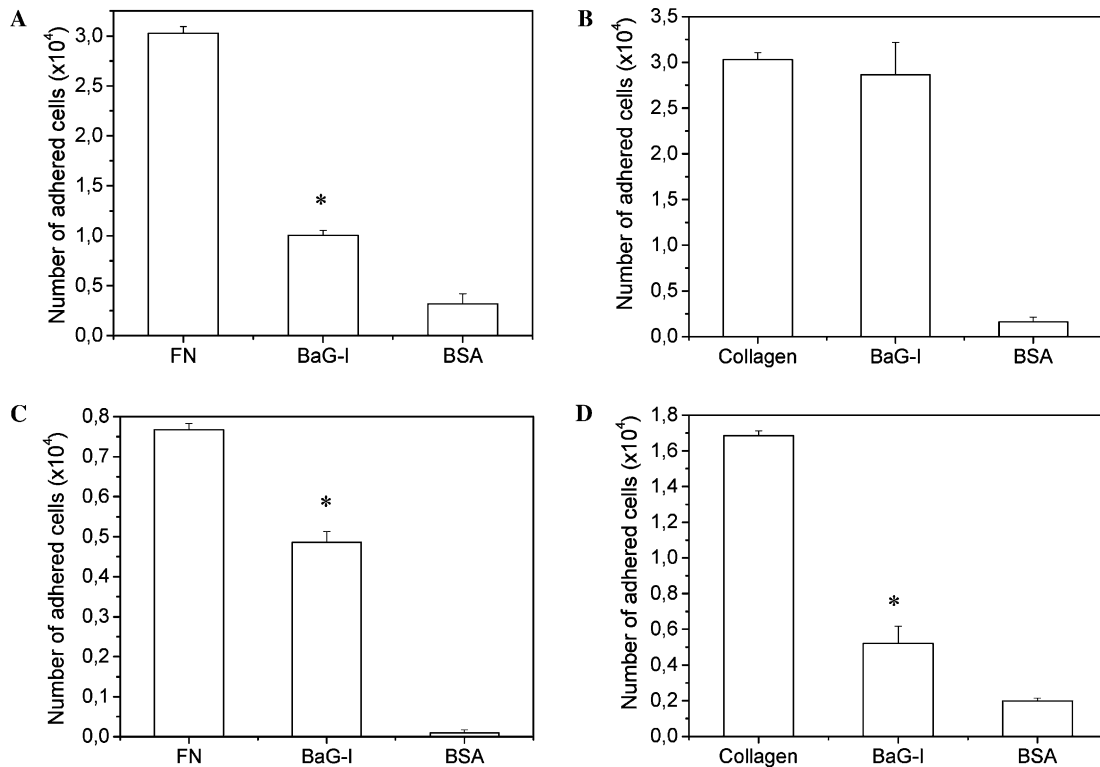


Fig. 5. BaG-I inhibits fibronectin-mediated cell adhesion (A) and does not inhibit cell adhesion to collagen type I (B). Fibronectin or collagen type I ($1 \mu\text{g}/\text{well}$) was immobilized overnight at 4°C on a 96-well plate in adhesion buffer. After blocking with 1% BSA, the CMFDA-labeled K562 cells (A) or K562- $\alpha_2\beta_1$ -transfected cells (B) (1×10^5 cells/well) plus BaG-I ($4 \mu\text{M}/\text{well}$) were added to each well and the plate was incubated at 37°C for 30 min. The remaining cells were lysed and the plate was read on a fluorescence plate reader. (C) BaG-I supports K562 cell adhesion and (D) does not promote K562- $\alpha_2\beta_1$ -transfected cell adhesion. In this experiment, BaG-I ($10 \mu\text{g}/\text{well}$) was used as adhesion substrate. Error bars indicate SE from triplicate samples in three independent experiments. Binding to immobilized fibronectin (FN, A and C) or collagen (B,D) is also shown for comparison. Negative control of adhesion was made with BSA. For details, see Materials and methods. * $p < 0.05$ (Duncan's post hoc analysis).

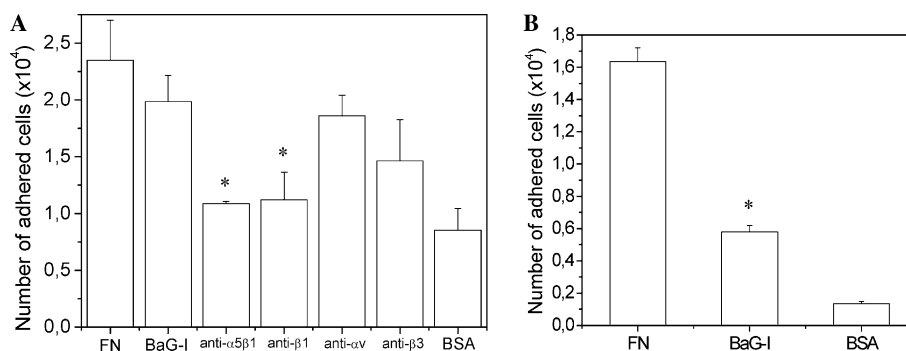


Fig. 6. BaG binds to K562 cells by $\alpha_5\beta_1$ integrin. (A). BaG-I (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) was immobilized overnight at 4 °C on a 96-well plate in adhesion buffer. After blocking with 1% BSA, the CMFDA-labeled K562 cells ($1 \times 10^5/\text{well}$) plus anti- $\alpha_5\beta_1$, anti- β_1 , anti- α_v , or anti- β_3 antibodies were added to each well and the plate was incubated at 37 °C for 30 min. The remaining cells were lysed and the plate was read on a fluorescence plate reader. Binding to immobilized fibronectin (FN) is shown for comparison. (B) BaG induces the detachment of K562 cells from fibronectin. BaG-I (4 M/well) was added on cells plated on fibronectin (1 $\mu\text{g}/\text{well}$) as described above and incubated for 2 h. Remaining cells were then lysed and fluorescence was read. Error bars indicate SE from triplicate samples in three independent experiments. For details, see Materials and methods. * $p < 0.05$ (Duncan's post hoc analysis).

little effects on the inhibition of K562 cell adhesion (Fig. 6A). These results strongly suggest that the disintegrin domain of BaG binds to the $\alpha_5\beta_1$ integrin on K562 cells, thus supporting adhesion.

BaG can also induce the detachment of K562 cells from fibronectin (Fig. 6B). K562 cells bound to fibronectin were incubated with BaG-I (4 μM) for 2 h. After this time, detached cells were removed by washing. In this procedure approximately 64% of K562 cells were detached from fibronectin by BaG-I (Fig. 6B).

Discussion

Cell adhesion is a critical event in many biological phenomena such as development, differentiation, signal transduction, maintenance of tissue structure, wound healing, and tumor metastasis. Integrins can mediate cellular adhesion by connecting the extracellular matrix (ECM) components to the cell cytoskeleton [19,20]. In the absence of appropriate ECM contacts, cells undergo programmed cell death or apoptosis [44]. In platelets, the blockage of integrin binding inhibits aggregation. Disintegrins having the adhesive sequence RGD are potent inhibitors of fibrinogen-dependent platelet aggregation induced by ADP. Therefore, inhibitors of integrin binding such as the disintegrins have become interesting targets for drug design.

Several dimeric disintegrins have been isolated from snake venom but only a few precursor forms of these proteins have been described [33,34]. BaG was isolated from *B. alternatus* venom and it was shown to have both metalloprotease and disintegrin/cysteine-rich domains. It is a dimer linked by disulfide bonds since treatment with β -mercaptoethanol disrupts the oligomer.

Due to the low yield of purified protein, it was not possible to separate the chains or subunits of BaG for

protein sequencing. However, partial sequence data obtained by LC-MS-MS confirmed that BaG belongs to the P-III class of SVMPs. Interestingly, BaG does not have any hemorrhagic activity, as usually found for monomeric P-III SVMPs [1,41]. Recently, a hemorrhagic, dimeric SVMP, bilitoxin-1, was purified and characterized from the *Agkistrodon bilineatus* venom [30]. Bilitoxin-1 is a homodimeric P-II SVMP of 80 kDa with a disintegrin domain that lacks the RGD consensus sequence, but instead RGD is replaced by a MGD sequence. The importance of this substitution is unknown but the authors suggested that it could impair the disintegrin domain from acting as an $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist. However, the question if dimerization leads to an improvement or loss of hemorrhagic activity remains to be addressed.

Other members of the P-III class of SVMPs have been described as inhibitors of collagen binding to the $\alpha_2\beta_1$ integrin having no effect on fibronectin binding [5,45,46]. Therefore, BaG, which binds to $\alpha_5\beta_1$ integrin, may be a novel member of this class of SVMPs. The cloning and cDNA sequencing of BaG is currently underway in our laboratory.

BaG strongly reacts with anti-echistatin antibodies. Echistatin is a small (5 kDa) RGD-disintegrin isolated from *Echis carinatus* venom [37] that inhibits fibrinogen binding to the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin in platelets. Reduced BaG does not cross-react with these antibodies. This suggests that conformational epitopes similar to the ones in echistatin may be present in BaG. Interestingly, BaG did not react with antibodies produced against a non-RGD disintegrin alternagin-C, an inhibitor of collagen binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin [5] further supporting the cell adhesion data that BaG contains RGD motifs.

EC3 [28] and EMF10 [29] are two well-characterized heterodimeric disintegrins that bind to the $\alpha_5\beta_1$ integrin,

but with different specificities. While EC3 inhibited the adhesion of K562 cells with an IC_{50} of 150 nM, the IC_{50} of EMF10 is 1–4 nM. Contortrostatin, a homodimeric disintegrin purified from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom [27], also binds to $\alpha_5\beta_1$ integrin, and thus inhibits cell adhesion to fibronectin. In a mouse model, it has been demonstrated that contortrostatin inhibits lung colonization of melanoma cells [47]. Recently, two homologous dimeric disintegrins, CC5 and CC8, have been purified from the *Cerastes cerastes* venom. Both CC5 and CC8 inhibited the adhesion of cells expressing integrins $\alpha_5\beta_1$ as well as $\alpha_{IIb}\beta_3$, and $\alpha_v\beta_3$ to appropriate ligands [32]. All these proteins are examples of processed disintegrins from their metalloprotease precursors.

BaG is an inhibitor of fibronectin binding to the $\alpha_5\beta_1$ integrin. The IC_{50} for BaG is 3.75 μ M, which is higher than the values found for processed disintegrins. However, BaG includes the metalloprotease domain, which may contribute to the increase of IC_{50} . It is also possible that the processing of the disintegrin domain increases its affinity for its integrin target.

BaG-I inhibits ADP-induced platelet aggregation, which indicates that it could be an antagonist of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin. Furthermore, BaG-I induced the detachment of cells that were previously bound to fibronectin. These results suggest that BaG may bind to both $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins, as usually reported for some RGD-disintegrins. It is interesting that BaG-I can release cells bound to fibronectin, thus suggesting that it probably competes with fibronectin to the same binding sites on the integrin molecule. Since BaG was treated with 1,10-phenanthroline, its proteolytic effect on fibronectin was discarded. It is probable that the detached cells undergo anoikis although it was not confirmed yet. Brassard et al. [48] showed that echistatin treatment of adherent AvB3-293 cells resulted in substratum detachment and activation of apoptosis in 1 h due to the activation of intracellular signals.

The $\alpha_5\beta_1$ integrin, a major fibronectin receptor, is an RGD-dependent receptor. It is a widely distributed integrin that is essential for cell growth and organ development [19,20]. Other studies indicate that this integrin plays a significant role in cell growth and cancer metastasis [49]. Integrin $\alpha_5\beta_1$ mediates elimination of amyloid β peptide and may protect neuronal cells against apoptosis, which is an essential event in the course of the Alzheimer disease [50]. It has been found that $\alpha_5\beta_1$ -mediated adhesion up-regulated the anti-apoptosis protein Bcl-2 [51] and it activates the signaling protein ShC [52]. Therefore, BaG a metalloproteinase/disintegrin that interacts with $\alpha_5\beta_1$ integrin can be an interesting tool for cell proliferation studies in normal and tumor tissues.

The structural diversity of disintegrins leading to their specificity is not well understood and for future exploi-

tation for clinical applications more study is required. This is the first dimeric SVMP reported from the genus *Bothrops* and, despite the fact that the complete primary structure of BaG is not known yet, the results shown here suggest that it is a ligand for the integrin $\alpha_5\beta_1$, thereby indicating BaG as a novel member of the family of dimeric PIII-derived disintegrins.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP, Brazil (00/05520-2), CNPq, Brazil (521542/96-0), and International Foundation for Science, Sweden (F/2631-1).

References

- [1] J.B. Bjarnason, J.W. Fox, *Pharmac. Ther.* 62 (1994) 325–372.
- [2] N.M. Hooper, *FEBS Lett.* 354 (1994) 1–6.
- [3] E.N. Baramova, J.D. Shannon, J.B. Bjarnason, J.W. Fox, *Arch. Biochem. Biophys.* 275 (1989) 63–71.
- [4] L.G. Jia, K.I. Shimokawa, J.B. Bjarnason, J.W. Fox, *Toxicol.* 34 (1996) 1269–1276.
- [5] D.H.F. Souza, M.R.C. Iemma, L.L. Ferreira, J.P. Faria, M.L.V. Oliva, R.B. Zingali, S. Niewiarowski, H.S. Selistre-de-Araujo, *Arch. Biochem. Biophys.* 384 (2000) 341–350.
- [6] A.S. Kamiguti, C.R.M. Hay, M. Zuzel, *Biochem. J.* 25 (1996) 267–278.
- [7] D.G. Myles, L.H. Kimmel, C.P. Blobel, J.M. White, P. Primakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 4195–4198.
- [8] T. Yagami-Hiromasa, T. Sato, T. Kurisaki, K. Kamijo, Y. Nebeshima, Y. Fujisawa-Sehara, *Nature* 377 (1995) 652–656.
- [9] R.A. Black, C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Bioani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, D.P. Ceretti, *Nature* 385 (1997) 729–733.
- [10] C. Cho, D.O. Bunch, J.E. Faure, E.H. Goulding, E.M. Eddy, P. Primakoff, D.G. Myles, *Science* 281 (1998) 1857–1859.
- [11] F.M. Shilling, C.R. Magie, R. Nuccitelli, *Dev. Biol.* 202 (1998) 113–224.
- [12] J. Rooke, D. Pan, T. Xu, G.M. Rubin, *Science* 273 (1996) 1227–1231.
- [13] C.P. Blobel, *Cell* 90 (1997) 589–592.
- [14] T.G. Wolfsberg, J.M. White, *Dev. Biol.* 180 (1996) 389–401.
- [15] D. Yamada, Y. Shin, T. Morita, *FEBS Lett.* 451 (1999) 299–302.
- [16] M.S. Dennis, W.J. Henzel, R.M. Pitti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1989) 2471–2475.
- [17] R.J. Gould, M.A. Polokoff, P.A. Friedman, T.F. Huang, J.C. Holt, J.J. Cook, S. Niewiarowski, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195 (1990) 168–171.
- [18] S. Niewiarowski, M.A. McLane, M. Kloczewiak, G.J. Stewart, *Sem. Hematol.* 31 (1994) 289–300.
- [19] R.O. Hynes, *Cell* 69 (1992) 11–25.
- [20] R.O. Hynes, *Trends Cell Biol.* 9 (1999) M33–M37.
- [21] M.K. Yamada, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 12809–12812.
- [22] T.F. Huang, J.C. Holt, H. Lukasiewicz, S. Niewiarowski, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 16157–16163.
- [23] K. Muruayama, T. Kawasaki, Y. Sakai, Y. Taniuchi, M. Shimizu, H. Kawashima, T. Takaenaka, *Peptides* 18 (1997) 73–78.

- [24] A.L.J. Coelho, M.S. De Freitas, A.L. Oliveira-Carvalho, V. Moura-Neto, R.B. Zingali, C. Barja-Fidalgo, *Exp. Cell Res.* 251 (1999) 379–387.
- [25] M.A. Belisario, S. Tafuri, C. Di Domenico, R. Della Morte, C. Squillacioti, A. Lucisano, N. Staiano, *Biochim. Biophys. Acta* 1497 (2000) 227–236.
- [26] P. Zigrino, A.S. Kamiguti, J. Eble, C. Drescher, R. Nischt, J.W. Fox, C. Mauch, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 40528–40535.
- [27] M. Trikha, Y.A. De Clerck, F.S. Markland, *Cancer Res.* 54 (1994) 4993–4998.
- [28] C. Marcinkiewicz, J.J. Calvete, S. Vijay-kumar, M.M. Marcinkiewicz, M. Raida, P. Shick, R.R. Lobb, S. Niewiarowski, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 12468–12473.
- [29] C. Marcinkiewicz, J.J. Calvete, S. Vijay-kumar, M.M. Marcinkiewicz, M. Raida, P. Shick, R.R. Lobb, S. Niewiarowski, *Biochemistry* 38 (1999) 13302–13309.
- [30] T. Nikai, K. Taniguchi, Y. Komori, M. Katsuyoshi, J.W. Fox, H. Sugihara, *Arch. Biochem. Biophys.* 378 (2000) 6–15.
- [31] A. Gasmı, N. Srairi, S. Guermazi, H. Dkhill, H. Karoui, M. El Ayebe, *Biochim. Biophys. Acta* 1547 (2001) 51–56.
- [32] J.J. Calvete, J.W. Fox, A. Agelan, S. Niewiarowski, C. Marcinkiewicz, *Biochemistry (US)* 41 (2002) 2014–2021.
- [33] Q. Zhou, P. Hu, M.R. Ritter, S.D. Swenson, S. Argounova, A.L. Epstein, F.S. Markland, *Arch. Biochem. Biophys.* 375 (2000) 278–288.
- [34] D. Okuda, H. Koike, T. Morita, *Biochemistry* 41 (2002) 14248–14254.
- [35] E.K. Johnson, C.L. Ownby, *Int. J. Biochem.* 25 (1993) 267–278.
- [36] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [37] Z.R. Gan, R.J. Gould, J.W. Jacobs, P.A. Friedman, M.A. Polokoff, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 19827–19832.
- [38] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [39] S. Fujimura, K. Oshikawa, S. Terada, E. Kimoto, *J. Biochem.* 128 (2000) 167–173.
- [40] L.A. Hite, L.G. Jia, J.B. Bjarnason, J.W. Fox, *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1) (1994) 182–191.
- [41] M.J. Paine, H.P. Desmond, R.D.G. Theakston, J.M. Crampton, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 22869–22876.
- [42] M.T. Assakura, C.A. Silva, R. Mentele, A.C.M. Camargo, S.M.T. Serrano, *Toxicol.* 41 (2003) 217–227.
- [43] H.S. Selistre-de-Araujo, D.H.F. Souza, C.L. Ownby, *Biochim. Biophys. Acta* 1342 (1997) 109–115.
- [44] J.E. Meredith, M.A. Schwartz, *Trends Cell Biol.* 7 (1997) 146–150.
- [45] A.M. Moura-da-Silva, C. Marcinkiewicz, M. Marcinkiewicz, S. Niewiarowski, *Thromb. Res.* 102 (2001) 153–159.
- [46] J.A. Eble, B. Beermann, H.-J. Hinz, A. Schmidt-Hederich, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12274–12284.
- [47] M. Trikha, W. Rote, P. Manley, B.R. Lucchesi, F.S. Markland, *Thromb. Res.* 73 (1994) 39–52.
- [48] D.L. Brassard, E. Maxwell, M. Malkowski, T.L. Nagabhushan, C.C. Kumar, L. Armstrong, *Exp. Cell Res.* 251 (1999) 33–45.
- [49] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12 (1996) 697–715.
- [50] M.L. Matter, Z. Zhang, C. Nordstedt, E. Ruoslahti, *J. Cell. Biol.* 141 (1998) 1019–1030.
- [51] Z. Zhang, K. Vuori, J.C. Reed, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1995) 6728–6733.
- [52] K. Wary, F. Mainiero, S. Isakoff, E. Marcantonio, F. Giancotti, *Cell* 87 (1996) 733–743.

Alternagin-C, a Disintegrin-like Protein, Induces Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF) Expression and Endothelial Cell Proliferation *in Vitro**

Received for publication, October 27, 2003, and in revised form, February 2, 2004
Published, JBC Papers in Press, February 6, 2004, DOI 10.1074/jbc.M311771200

Márcia R. Cominetti‡, Cristina H. B. Terruggi‡, Oscar H. P. Ramos, Jay W. Fox§, Andrea Mariano-Oliveira¶, Marta S. De Freitas¶, Camila C. Figueiredo||, Veronica Morandi||, and Heloisa S. Selistre-de-Araujo**

From the Department of Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, SP, 13565-905, Brazil, the Departments of ¶Biologia Celular e Genética and ¶Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 20550-013, Brazil, and the §Department of Microbiology, University of Virginia Health System, Charlottesville, Virginia 22908-0734

Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein purified from the venom of the Brazilian snake *Bothrops alternatus*, interacts with the major collagen I receptor, the $\alpha_2\beta_1$ integrin, inhibiting collagen binding. Here we show that ALT-C also inhibits the adhesion of a mouse fibroblast cell line (NIH-3T3) to collagen I (IC₅₀ 2.2 μ M). In addition, when immobilized on plate wells, ALT-C supports the adhesion of this cell line as well as of human vein endothelial cell (HUVEC). ALT-C (3 μ M) does not detach cells that were previously bound to collagen I. ALT-C (5 nM) induces HUVEC proliferation *in vitro*, and it inhibits the positive effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) or FGF-2 on the proliferation of these cells, thus suggesting a common mechanism for these proteins. Gene expression analysis of human fibroblasts growing on ALT-C- or collagen-coated plates showed that ALT-C and collagen I induce a very similar pattern of gene expression. When compared with cells growing on plastic only, ALT-C up-regulates the expression of 45 genes including the VEGF gene and down-regulates the expression of 30 genes. Fibroblast VEGF expression was confirmed by RT-PCR and ELISA assay. Up-regulation of the VEGF gene and other growth factors could explain the positive effect on HUVEC proliferation. ALT-C also strongly activates Akt/PKB phosphorylation, a signaling event involved in endothelial survival and angiogenesis. In conclusion, ALT-C acts as a survival factor, promoting adhesion and endothelial cell proliferation.

Cell attachment to the extracellular matrix depends mostly on the integrins, a large family of glycoproteins expressed at the cell surface (1). Integrins are heterodimers formed of non-covalently associated α - and β -subunits (2). In many cells in culture, integrin-mediated adhesion results in specialized adhesion sites, named focal contacts (3). In these sites, structural

and signaling proteins such as integrins, cytoskeletal proteins, and kinases are concentrated and initiate signal transduction pathways (4). Aggregation of integrin receptors, ligand occupancy, and tyrosine kinase-mediated phosphorylation are the key events that results in diverse processes such as cell migration and differentiation, tissue remodeling, cell proliferation, angiogenesis, and tumor cell invasion and metastasis (1, 5).

Antagonists of integrins have been developed in order to provide powerful therapeutic approaches for the treatment of several types of cancer, such as antibodies to the α_v integrin (6). Synthetic peptides with the sequence Arg-Gly-Asp (RGD) can competitively block the binding of several integrins to their ligands and efficiently reduce platelet aggregation and the number of experimental metastasis (7). RGD peptides induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells and disrupt the actin cytoskeleton (8). Disintegrins are small peptides derived from viperidae snake venoms with an internal RGD or KGD motif (9). Disintegrins can bind to integrins and interfere with integrin function. In platelets, disintegrins inhibit the adhesion of fibrinogen to its receptor, the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, resulting in inhibition of platelet aggregation (10, 11). Some RGD-disintegrins have been shown to inhibit tumor cell-extracellular matrix adhesion (12) and decrease the number of experimental metastasis (13, 14). RGD-disintegrins bind mostly to $\alpha_5\beta_1$ or $\alpha_v\beta_3$ integrins in distinct cell types therefore inhibiting also cell adhesion to fibronectin (13). Accutin and triflavin, two RGD-disintegrins from *Agkistrodon acutus* and *Trimeresurus flavoviridis* venoms, respectively, inhibit angiogenesis and induce apoptosis in endothelial cells (15, 16). The VAP1 protein (vascular apoptosis-inducing protein) isolated from *Crotalus atrox* venom is a metalloprotease/disintegrin that induces apoptosis (17). Since it was shown that the RGD-dependent $\alpha_v\beta_3$ integrin provides a survival signal to proliferative endothelial cells during new blood vessel growth (18, 19), it is thought that the anti-adhesive activity of RGD-disintegrins on endothelial cells may contribute to their anti-angiogenic activity.

A different class of disintegrin is also found in some snake venoms that do not have the RGD motif. These proteins are larger than the RGD-disintegrins (about 30 kDa) and they have an extra C-terminal, cysteine-rich domain (20–24). These disintegrin-like proteins do not bind to the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, or $\alpha_v\beta_3$, but they interact with the collagen receptor, the $\alpha_2\beta_1$ integrin therefore inhibiting cell adhesion to collagen I (23).

The majority of the RGD and non-RGD disintegrins is synthesized in the venom gland as precursor forms having a pro- and metalloprotease domains, and proteolytic processing of

* This work was supported by Grants from FAPESP (98/14138-2, 00/05520-2, 00/09495-2R), CNPq (521542/96-0), CAPES, Brazil, and International Foundation for Science, (F/2631-1), Sweden. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Both authors contributed equally to this work.

** To whom correspondence should be addressed: Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil. Tel.: 55162608333; Fax: 55162608327; E-mail: hsaraujo@power.ufscar.br.

these proteins releases the disintegrin-like/cysteine-rich domain (20–21,23). It is possible to isolate the full-length protein or the processed domains from the venoms. Related proteins (the ADAMs,¹ for a disintegrin and metalloproteinase) are found in mammals as well as in several other organisms, in which they are involved in several physiological processes such as fertilization, cell differentiation, and shedding of receptors (25). The ADAMs have a similar domain organization with extra domains including transmembrane and intracellular domains (26). Both ADAMs and snake venom metalloproteinases (SVMPs) belong to the Reprolysin protein family of metalloproteases (27).

We have previously described the isolation and characterization of ALT-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom (23). ALT-C is synthesized as a precursor form with a metalloprotease domain, from which is released after proteolytic processing, yielding a form with disintegrin and cysteine-rich domains (23). ALT-C binds to the $\alpha_2\beta_1$ integrin-transfected-K562 cells therefore inhibiting collagen I adhesion (IC₅₀, 100 nM). When immobilized on plate wells, ALT-C promotes the adhesion of $\alpha_2\beta_1$ integrin transfected-K562 cells but not the adhesion of control cells. ALT-C does not bind to the integrins $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, and $\alpha_4\beta_1$ (23). In human neutrophils, ALT-C also induces migration via integrin signaling, with activation of focal adhesion kinase (FAK) and its association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), leading to the increase in the content of F-actin and Erk-2 nuclear translocation (28). It has been demonstrated that jararagin, a metalloprotease/disintegrin homologue from *Bothrops jararaca* venom mimics the collagen interaction with fibroblasts resulting in an up-regulation of the $\alpha_2\beta_1$ integrin and the matrix metalloproteases *MMP-1* and *MT1-MMP* genes (29). Therefore, disintegrin-like proteins can activate integrins leading to significant modifications of cellular events and it may be in a different way from the RGD-disintegrins. However, these events are not well understood yet.

In the present work we show that ALT-C induces endothelial cell proliferation *in vitro*, and these effects could be mediated at least in part by an increased expression of vascular endothelial growth factor. These effects are opposite to those observed for most RGD-disintegrins, which inhibit angiogenesis and induce apoptosis (15, 30). To our knowledge, this is the first report of a disintegrin acting as a survival factor.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—The venom of *B. alternatus* was kindly provided by the venom commission of Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. Alternagin-C (ALT-C) was purified from *B. alternatus* as previously described (23). Recombinant human FGF-2, VEGF₁₆₅ and the mouse anti-VEGF monoclonal antibody (clone 26503) were purchased from R&D Systems, Minneapolis, MN. Genistein, LY294002, PMA, and bisindolylmaleimide IV (BIM) were from Calbiochem, San Diego, CA. Protein A/G-agarose, anti-Akt, and anti-phosphotyrosine antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, streptavidin-conjugated horseradish peroxidase was from Caltag Laboratories.

Cell Lines—Mouse embryo fibroblasts NIH-3T3 were from American Type Culture Collection. Human fibroblasts were obtained from Clonetics™.

¹ The abbreviations used are: ADAM, a disintegrin and metalloprotease; Akt/PKB, protein kinase B; BIM, bisindolylmaleimide IV; BSA, bovine serum albumin; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; EGR, early growth response; FAK, focal adhesion kinase; FGF-2, fibroblast growth factor 2; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IL-11, interleukin 11; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; TGF β , transforming growth factor- β ; VEGF, vascular endothelial growth factor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ALT-C, Alternagin-C.

Isolation of Human Endothelial Cells—Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were routinely obtained by treatment of umbilical veins with 0.1% collagenase IV solution (Sigma) as previously described (31) and maintained in 199 medium (M-199) with HEPES (Sigma) supplemented with antibiotics (100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin), 2 mM glutamine, and 20% fetal calf serum (FCS, Cultilab, Campinas, Brazil), at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere until they reached confluence. Cells were used in first or second passages only, and subcultures were obtained by treatment of confluent cultures with 0.025% trypsin/0.02% EDTA solution in PBS.

Inhibition of Cell Adhesion—Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum, L-glutamine, streptomycin, fungizone, and geneticin in the case of transfected cells at 37 °C in a water-jacketed CO₂ incubator. Adhesion of cells labeled with 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) was performed as described previously (23). Briefly, collagen type I (1 μ g/well), was immobilized on a 96-well microtiter plates (Falcon, Pittsburgh, PA) in 20 mM HEPES buffer plus 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, and 1 mM MnCl₂ (adhesion buffer) overnight at 4 °C. Wells were blocked with 1% BSA in adhesion buffer. Cells (5 \times 10⁶/ml) were labeled by incubation with 12.5 μ M 5-chloromethylfluorescein diacetate in adhesion buffer at 37 °C for 30 min. Unbound label was removed by washing with the same buffer. Labeled cells were incubated with ALT-C at several concentrations before being transferred to the plate (1 \times 10⁵ cells/well) and incubated at 37 °C for 30 min. After washing to remove unbound cells, the remaining cells were lysed by the addition of 0.5% Triton X-100. In parallel, a standard curve was prepared in the same plate using known concentrations of labeled cells. The plates were read using a Spectra-Max Gemini XS fluorescence plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) with a 485-nm excitation and 530-nm emission filters.

Adhesion and Detachment Assays—To test if ALT-C could induce cell adhesion, plate wells were coated with ALT-C (0.5–20 μ g/ml), and labeled cells were allowed to adhere for 2 h at 37 °C, followed by lysis and measurement of released fluorescence. For detachment assays, collagen type I (0.1–1 μ g/well) was immobilized on a 96-microtiter well plate in adhesion buffer overnight at 4 °C. CMFDA-labeled cells (1 \times 10⁵ cells/well) were allowed to adhere for 30 min at 37 °C followed by the addition of disintegrins to the medium. After washing with adhesion buffer to remove unbound cells, the remaining cells were lysed, and the plate was read as described above. In the case of HUVECs, the percentage of adhered cells was determined by adding MTT (0.5 mg/ml, final concentration) and incubating at 37 °C for 3 h at 5% CO₂. The solution was removed and replaced by 200 μ l of isopropyl alcohol, and the absorbance of the solution was measured at 595 nm.

Cell Proliferation Assay—HUVECs (10⁴ cells/well) were incubated in a 96-well plate in 100 μ l of 199 medium plus 5% FBS for 2 h at 37 °C and 5% CO₂. Then, 100 μ l of fresh medium having FGF-2 or VEGF, ALT-C or both at different concentrations were added to each well, followed by 72 h incubation at 37 °C and 5% CO₂. Cell concentration was measured by adding MTT (0.5 mg/ml, final concentration) and incubating at 37 °C for 3 h at 5% CO₂ as described above. For assays with mouse fibroblasts, FGF-2 and VEGF were omitted. Cell proliferation was also measured in response to immobilized ALT-C. 96-well culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were incubated with ALT-C solutions in PBS (1–20 μ g/ml), overnight at 4 °C. After blockade with 0.1% BSA in PBS, 1 \times 10⁴ cells/well were seeded in 199 medium supplemented with 5% fetal calf serum and grown for 72 h. In order to investigate the possibility that the cell counts obtained after 72 h merely reflected a proportional difference in initial cell adhesion rates for each condition, an adhesion assay was run in parallel, and revealed after allowing cells to adhere for 2 h. The number of cells was then quantified by the MTT procedure as above.

Gene Expression—Plate wells were coated overnight with ALT-C (10 μ g/ml) or collagen type I (40 μ g/ml) and then blocked with 1% BSA. Human fibroblasts (passage 4) at 80% confluence in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% fetal bovine serum were seeded (2 \times 10⁶ cells/ml) in 10-cm plastic dishes on ALT-C, collagen type I or directly on plastic and incubated for 2 h at 37 °C in 5% CO₂. Culture medium was removed, and cells were lysed with lysis buffer from QIAgen RNEasy kit for isolation of total RNA.

Target Preparation, GeneChip™ Hybridization, and Data Analysis—Labeled cRNA was synthesized from total RNA according to standard Affymetrix protocols. Briefly, 20 μ g per sample of total RNA and a poly(T) primer containing a T7 RNA polymerase promoter were used to generate double-stranded cDNA. A T7 based *in vitro* transcription reaction (Enzo BioArray High Yield RNA Transcription labeling kit) was used to generate biotin-labeled and amplified cRNA from double-stranded cDNA. Total RNA integrity and cRNA size distribution were

analyzed using agarose gel electrophoresis in an Agilent Bioanalyzer. Ten microgram samples of labeled cRNA were hybridized to Affymetrix HU-95A probe arrays, containing probes sets representing ~10,000 genes, for 16 h, and scanned with the Affymetrix GeneArray Scanner. Data were analyzed with Affymetrix Microarray Analysis Suite v 5.0 and dChip© softwares. Genes up- or down-regulated at statistical significant levels ($p < 0.05$) and a fold change of ≥ 1.5 were considered to be a significant change of gene expression compared with the control cells.

Analysis of VEGF Expression by RT-PCR and ELISA—Human fibroblasts were grown on 6 cm dishes coated with ALT-C (10 $\mu\text{g/ml}$), collagen type I (40 $\mu\text{g/ml}$) or collagen I treated with soluble ALT-C (400 nM). Cells were lysed 4, 24, and 48 h after treatment, and total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). Samples were treated with DNase before the experiments in order to discharge any contaminant DNA. RT-PCR was run using the Superscript one-step RT-PCR kit (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. The following VEGF primers were used: forward, GAGCGGAGAAAGCATTGTGTTT; reverse TGCAACGCGAGTCTGTGTTT. β -Actin primers were used in the same conditions as endogen controls (forward, CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAGGG, and reverse, CGGAGGAAGAGGATGCGGCAGTGG). PCR products were analyzed in a 2% agarose gel electrophoresis. For ELISA, cells were disrupted by using a cell lysis buffer made of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 plus 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml leupeptin, and 1 mg/ml pepstatin. ELISA assays were performed using the kit Quantikine immunoassay for human VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 200 μl of conditioned medium, cell extracts, controls or standards were added on each well, previously coated with human monoclonal anti-VEGF antibody. After 2 h of incubation, wells were washed and incubated with an enzyme-linked polyclonal anti-VEGF antibody. Following another wash, a substrate solution was added to wells and color developed in proportion to the amount of VEGF bound in the initial step. The plate was read on a Dynex plate reader with absorbance of 450 nm.

Immunoprecipitation and Immunoblotting for Detecting Akt/PKB Activation—HUVEC monolayers (5×10^5 cells/ml) were preincubated with genistein (80 μM), LY294002 (3 μM), or BIM (10 nM) for 10 min at 37 $^\circ\text{C}$ prior to incubation with PMA (30 nM) or ALT-C (5 nM) for 15 min at 37 $^\circ\text{C}$ in a 5% CO_2 atmosphere. Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ leupeptin, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pepstatin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The protein content in the cell extracts was determined by the method of Bradford (32). Lysates (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were incubated overnight at 4 $^\circ\text{C}$ with anti-Akt/PKB antibody (1:200). Then, protein A/G-agarose (20 $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein) was added, and samples were incubated at 4 $^\circ\text{C}$ under rotation for 2 h. The contents of Akt/PKB and phosphorylated Akt/PKB were analyzed by Western blotting. Cellular proteins (30 μg) were subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride filters (Hybond-P, Amersham Biosciences) and blocked with Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 1% bovine serum albumin. Primary antibodies used in Western analysis were anti-Akt/PKB (1:1000) and anti-phosphoserine (1:1000) antibodies. The polyvinylidene difluoride filters were next washed three times with Tween-TBS, followed by a 1-h incubation with appropriate secondary antibody conjugated to biotin. Then, the filters were incubated with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:1000). Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) staining. The bands were quantified by densitometry, using Scion Image Software (Scion Co., Frederick, MD). Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni's t test, and $p < 0.05$ was taken as statistically significant.

Statistical Analysis of Data—All adhesion and cell proliferation assays were analyzed for statistical significance. Each experiment was repeated three times in triplicate and mean and standard error mean were calculated. For the comparison of multiple concentrations of ALT-C against the control group, Dunnett's statistical approach was used. For the experiments with one dose of ALT-C in various cell types, each treated group was compared with its own control using one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post-hoc analysis. Acceptable p levels were * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

RESULTS

ALT-C Inhibits the Adhesion of Mouse Fibroblasts to Collagen I—It was previously reported by our group that ALT-C

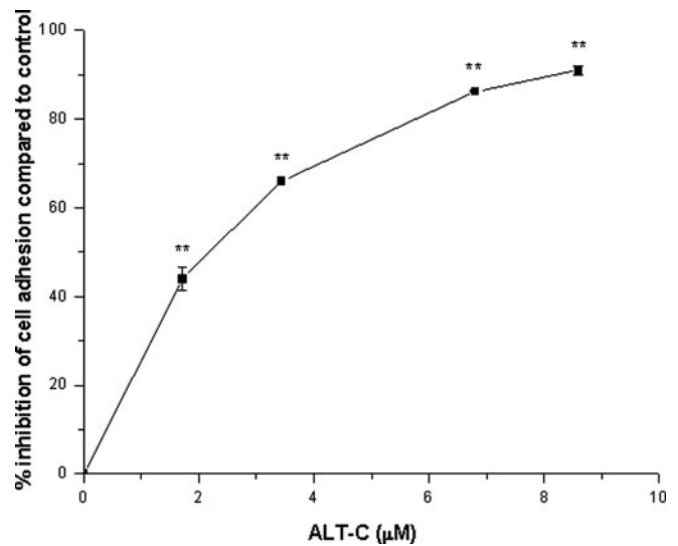


FIG. 1. ALT-C inhibits mouse fibroblasts adhesion to collagen I. 96-well plates were coated with collagen type I (1 $\mu\text{g}/\text{well}$) in 0.1% acetic acid overnight at 4 $^\circ\text{C}$. After blocking with 1% BSA, CMFDA-labeled cells (10^5 cells/well) were incubated with ALT-C and seeded in the wells. The plates were incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 30 min. After washing, remaining cells were lysed, and the plate was read for the release of fluorescence. The results were obtained from three independent experiments and in triplicate. The results for ALT-C were normalized by the collagen values without ALT-C in each experiment. The error bars show the S.E. of six samples with less deviation from the mean. The means for all ALT-C concentrations were significantly different from the collagen I using Dunnett's test: **, $p < 0.01$.

inhibits the adhesion of $\alpha_2\beta_1$ -transfected cells to collagen type I, with an IC_{50} of 100 nM (23). Here we show that the binding of mouse fibroblasts (NIH-3T3) to collagen I is also inhibited by ALT-C (Fig. 1). ALT-C inhibited collagen binding to fibroblasts with an IC_{50} of 2.2 μM . Inhibition was not 100% even in higher concentrations probably due to the presence of other collagen receptors in fibroblasts. These results suggest that the integrin $\alpha_2\beta_1$ is involved in the adhesion of this cell type in the binding of collagen I.

ALT-C Supports the Adhesion of Fibroblasts and Endothelial Cells—It was previously demonstrated that ALT-C supports the adhesion of $\alpha_2\beta_1$ -transfected K562 cells but not the control cells (23). Here we show that ALT-C also significantly supported the adhesion of fibroblasts and endothelial cells in a mass-dependent fashion (Fig. 2, A and B). Adhesion to collagen I was considered to be 100%. These results confirm the effect of ALT-C as an adhesion molecule.

In agreement with these data, ALT-C was unable to detach cells that were previously adhered to collagen I (Fig. 3A). We have done a collagen concentration \times adhesion curve for both fibroblasts and HUVECs, in which we could see that even collagen concentrations lower than 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ support cell adhesion (not shown). The collagen concentration that gives 50% of adhesion was 0.04 and 0.12 $\mu\text{g}/\text{well}$ for HUVECs and fibroblasts, respectively. The adhesion of mouse fibroblasts to collagen I (0.12 $\mu\text{g}/\text{well}$) was not affected by incubation with ALT-C (1–4 μM) for 2 h (Fig. 3A). Comparable results were obtained for HUVECs (Fig. 3B); however, lower ALT-C concentrations must be used since HUVECs from primary culture are more sensitive than the fibroblast cell line used in this work. Only at the dose of 100 nM ALT-C induced a low but significant detachment (10%). Thus, ALT-C strongly favors cell adhesion and does not reproduce the anti-adhesive actions already described for some RGD-type disintegrins (33–34).

ALT-C Induces Endothelial Cell Proliferation—The ability to antagonize cell adhesion has been described as a main feature

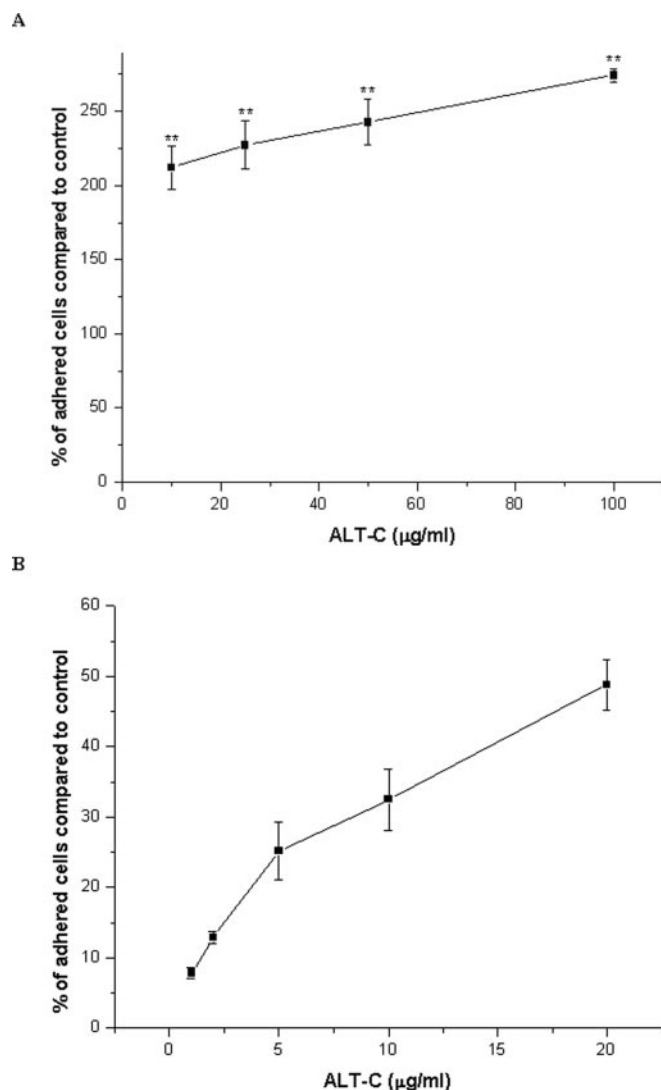


FIG. 2. ALT-C supports the adhesion of mouse fibroblasts and HUVEC cells. *A*, 96-well plates were coated with ALT-C (10–100 μg/ml) or collagen I (1 μg/well) in adhesion buffer at 4 °C. After blocking with 1% BSA, CMFDA-labeled mouse fibroblasts (NIH-3T3) cells (10^5 cells/well) were seeded in the wells. The plates were incubated at 37 °C for 30 min, washed, lysed and read as in Fig. 1. The results were obtained from three independent experiments in triplicate. The means that are significantly different from those of cells growing on collagen using Dunnett's test were shown by ** ($p < 0.01$). *B*, 96-well plates were coated with ALT-C (1–20 μg/ml) or collagen I (1 μg/well) in adhesion buffer at 4 °C. After blocking with 1% BSA, HUVEC cells were seeded and the experiment was performed as described earlier. The results for ALT-C were normalized by the collagen values in each experiment. The error bars show the S.E. of six samples with less deviation from the mean.

of anti-angiogenic disintegrins. Since the disintegrin-like ALT-C promoted endothelial cell adhesion, we further investigated its effects on endothelial proliferation. The stimulation of endothelial cell proliferation achieved when ALT-C was immobilized on plastic was proportional to the concentration of ALT-C coated to plastic surfaces (Fig. 4A). In the presence of 5% fetal calf serum, no significant variations were seen in the initial adhesion rates among the different conditions (adhesion measured after 2 h from seeding cells), including cells adhering on wells coated only with BSA. However, only in wells coated with ALT-C the number of cells increased after 72 h, and the increase was dependent on ALT-C concentration (Fig. 4A). HUVECs were also responsive to treatment with different concentrations (1–100 nM) of soluble ALT-C (Fig. 4B). The induc-

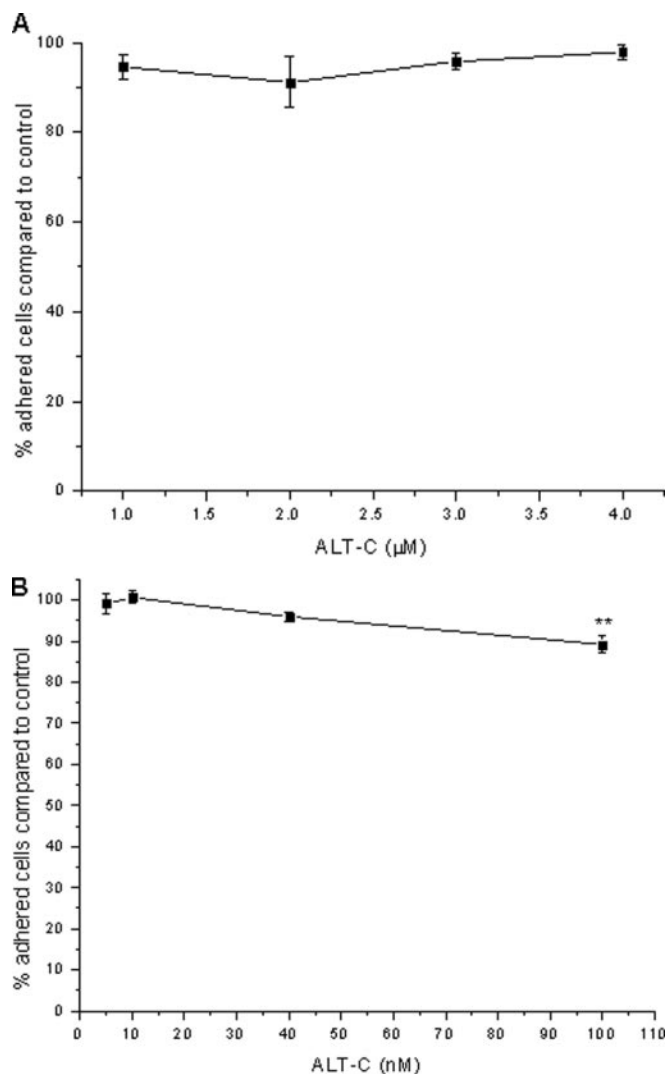


FIG. 3. ALT-C does not induce detachment of mouse fibroblasts (A) and HUVECs (B) from collagen I. 96-well plates were coated with collagen type I (0.12 μg/well) in 0.1% acetic acid overnight at 4 °C. After 1% BSA blockage, cells (10^5 cells/well) were seeded in the wells. The plates were kept at 37 °C for 30 min and then incubated with ALT-C at 37 °C for 2 h. After washing, remaining cells were counted. Adhesion to collagen was considered 100%. Results were obtained from three independent experiments in triplicate. Error bars show the S.E. of six samples with less deviation from the mean obtained by three independent experiments in triplicate. The mean significantly different from the control using Dunnett's test is shown by *, $p < 0.05$.

tion of proliferation observed when treating cells with 5 nM ALT-C was comparable to that observed with cultures treated with 10 ng/ml FGF-2 or 10 ng/ml VEGF, two potent angiogenic factors (Fig. 4B). Interestingly, concentrations of ALT-C greater than 10 nM significantly reduced this effect. ALT-C (10 and 100 nM) significantly inhibited the VEGF and FGF-2 effects, respectively (Fig. 4C). ALT-C did not induce proliferation of mouse fibroblasts in any of the doses and periods tested (Fig. 4D).

Gene Expression Induced by ALT-C—In order to explain the effects of ALT-C on cell proliferation, we performed a gene expression assay using the GeneChipTM technology. When compared with human fibroblast growing on plastic, ALT-C induced a significant increase in several genes related to cell cycle control, including VEGF (Fig. 5) and other growth factors such as inducible early growth response (TGFβ), interleukin 11 (IL-11), early growth response 2 and 3 (EGR2 and 3), and insulin-induced gene (IIG1). A total of 45 genes were up-regu-

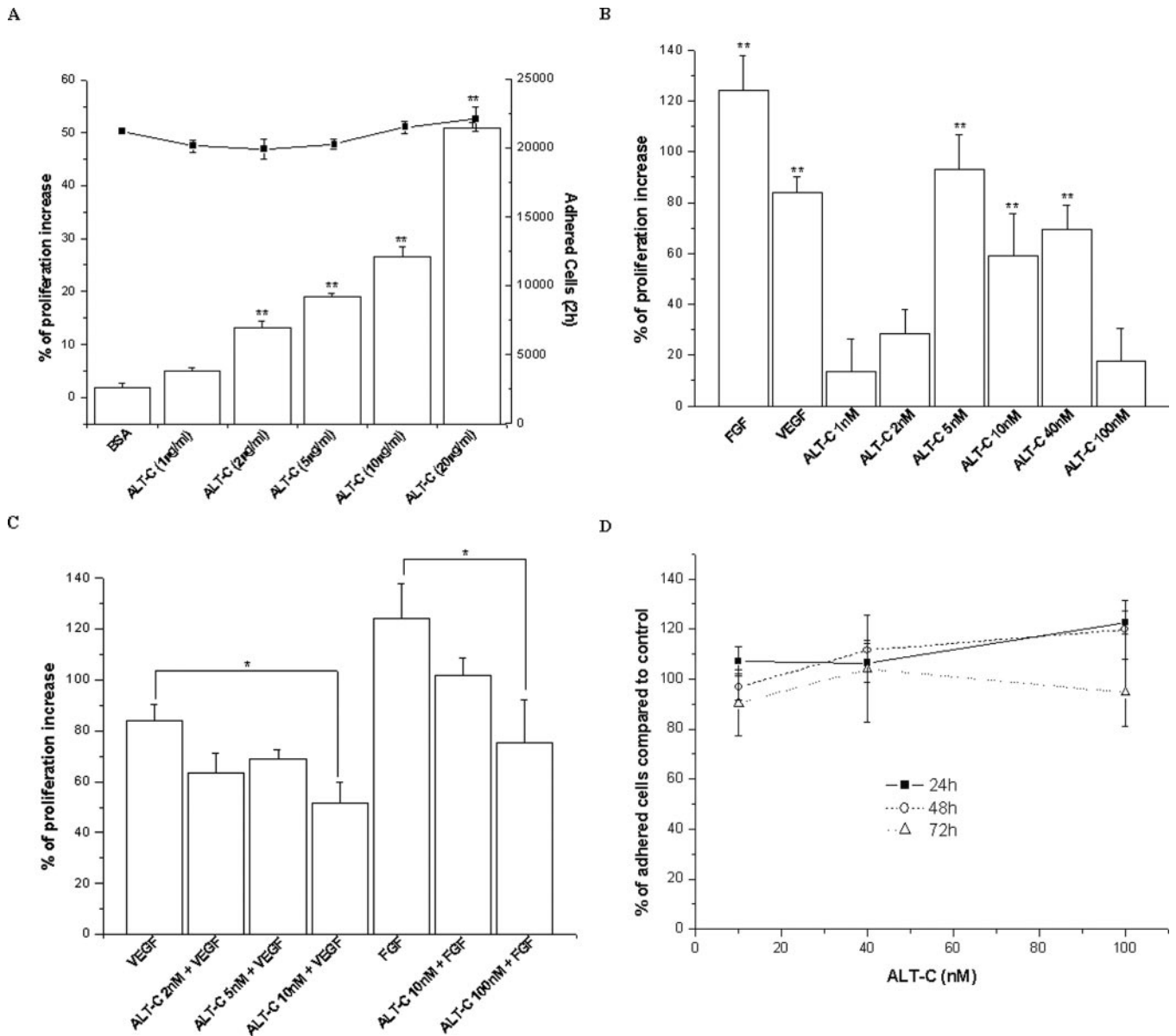


FIG. 4. ALT-C induces endothelial cell proliferation but does not induce mouse fibroblasts proliferation. *A*, HUVECs (10^4 cells/well) were seeded on 96-well plates coated with BSA or different concentrations of ALT-C (1–20 μ g/ml) in 2 h (solid line) or 72 h (bars) in 5% fetal calf serum (FCS) at 37 °C. After incubation, wells were washed and cell concentration was measured by adding MTT as described. *B*, different concentrations of soluble ALT-C (1–100 nM), FGF (10 ng/ml), or VEGF (10 ng/ml) were incubated with HUVECs (10^4 cells/well) on 96-well plates. After incubation, the wells were washed and the cell concentration was measured with MTT as described earlier. *C*, different concentrations of soluble ALT-C (2–100 nM) plus VEGF (10 ng/ml), FGF (10 ng/ml), or VEGF and FGF alone (10 ng/ml) were incubated with HUVECs (10^4 cells/well) on 96-well plates. After incubation, the wells were washed, and the cell concentration was measured with MTT as described earlier. The means significantly different from VEGF or FGF treated cells using Dunnett's test are shown by * ($p < 0.05$). *D*, mouse fibroblasts (10^4 cells/well) were seeded on 96-well plates coated with BSA. Different concentrations of ALT-C (10–100 nM) were added, and cells were incubated for 24, 48, or 72 h at 37 °C. After incubation time, the wells were washed and cell concentration was measured by adding MTT as described earlier. All results were obtained from three independent experiments in triplicate. Error bars show the S.E. of six samples with less deviation from the mean obtained by three independent experiments in triplicate. The means significantly different from control cells using Dunnett's test are shown by *, $p < 0.05$ or **, $p < 0.01$.

lated and 30 genes were down-regulated with this experiment. The expression of VEGF may explain the positive effect of ALT-C on HUVEC proliferation.

The effect of immobilized ALT-C is probably similar to the collagen effect since the differences in gene expression of these two proteins were much smaller (Fig. 6). A total of 8 genes were up-regulated, and 4 genes were down-regulated when comparing the expression induced by ALT-C and collagen I. The significance of this difference is not understood yet. VEGF expression induced when human fibroblasts were grown on both ALT-C- or collagen-coated dishes for 24 h was also confirmed by RT-PCR (Fig. 7A). However, striking differences were seen

when collagen-bound fibroblasts were treated with soluble ALT-C. VEGF expression was significantly increased after 48 h of incubation, while cells growing on immobilized ALT-C or collagen showed no difference (Fig. 7B).

ALT-C Induces Akt/PKB Phosphorylation in HUVECs— Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt/PKB signaling axis is activated by many angiogenic growth factors (36). To determine whether the Akt/PKB activating pathways were essential for the proliferative effect induced by ALT-C on endothelial cells, we incubated HUVEC monolayers with ALT-C (5 nM) for 15 min, in the absence or presence of different kinase inhibitors. The interaction of ALT-C with endothelial cells strongly

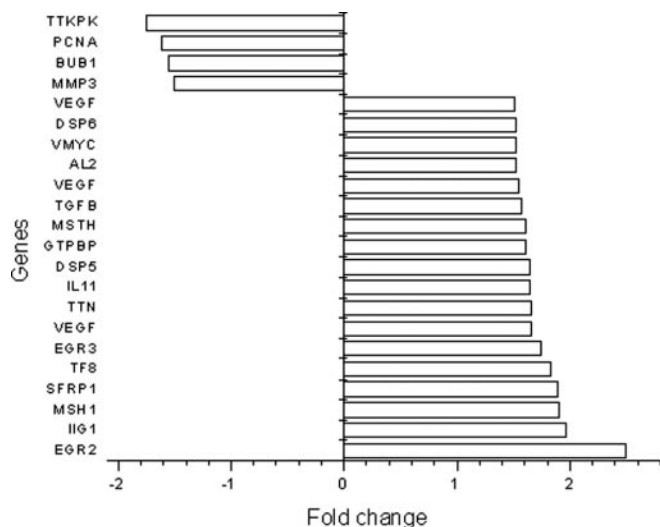


FIG. 5. Differences in the expression profile of cell proliferation-related genes of human fibroblasts growing on ALT-C compared with same cells growing on plastic dishes. Human fibroblasts were seeded on dishes coated or not with ALT-C and incubated for 2 h. Total RNA was isolated and reversely transcribed to cDNA which was used to produce cRNA. Labeled cRNA was synthesized and hybridized to Affymetrix HU-95A probe arrays for 16 h and scanned with the Affymetrix Gene Array Scanner. Genes up- or down-regulated at statistical significant levels ($p < 0.05$) and with a 1.5-fold change or greater compared with the control cells were considered. *TTKPK*, TTK protein kinase; *PCNA*, proliferating cell nuclear antigen; *BUB1*, budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast); *MMP3*, matrix metalloproteinase 3; *DSP6*, dual specificity phosphatase 6; *VMYC*, V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian); *AL2*, angiopoietin-like 2; *MSTH*, mesoderm-specific transcript homolog (mouse); *GTPBP*, GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle; *DSP5*, dual specificity phosphatase 5; *TTN*, tetranectin; *TF8*, transcription factor 8; *SFRP1*, secreted frizzled-related protein 1; *MSH1*, MSH homeobox homolog 1 (*Drosophila*); *IIG1*, insulin-induced gene 1. A total of 45 genes were up-regulated and 30 genes were down-regulated in this experiment.

activated Akt/PKB phosphorylation, as compared with control cultures (Fig. 8). Akt/PKB is a downstream target of activated PI3K (37) and PKC has been pointed as a key mediator of endothelial cell proliferation and differentiation (38, 39). Accordingly, ALT-C-activated Akt/PKB phosphorylation was abrogated by both LY294002, a selective inhibitor of PI3K, and BIM, a broad inhibitor of PKC family members. Tyrosine kinases may also contribute to the activation of Akt/PKB by ALT-C, since the treatment of HUVECs in the presence of genistein strongly inhibited Akt/PKB phosphorylation (Fig. 8).

DISCUSSION

We have previously demonstrated that ALT-C is a ligand for the major collagen I receptor, the integrin $\alpha_2\beta_1$ and also supports K562 cell adhesion mediated by this integrin (23). In this report we show that ALT-C also supports the adhesion of other cell types such as mouse fibroblasts and HUVECs. Moreover, the adhesion of fibroblasts to collagen I is inhibited by ALT-C, supporting the evidence that the $\alpha_2\beta_1$ integrin is a major collagen receptor in these cells. As would be expected for an adhesive protein, ALT-C failed to induce fibroblast and HUVEC detachment from collagen-coated surfaces, even in low collagen concentrations. It has been suggested that jararhagin, a metalloprotease with disintegrin-like and cysteine-rich domains, acts as a collagen agonist of the $\alpha_2\beta_1$ integrin, causing the activation of this integrin and producing collagen-like cell signaling events such as the up-regulation of matrix metalloproteases (29). Since ALT-C does not have the metalloprotease domain, the results presented here provide strong evidence that the disintegrin and cysteine-rich domains are

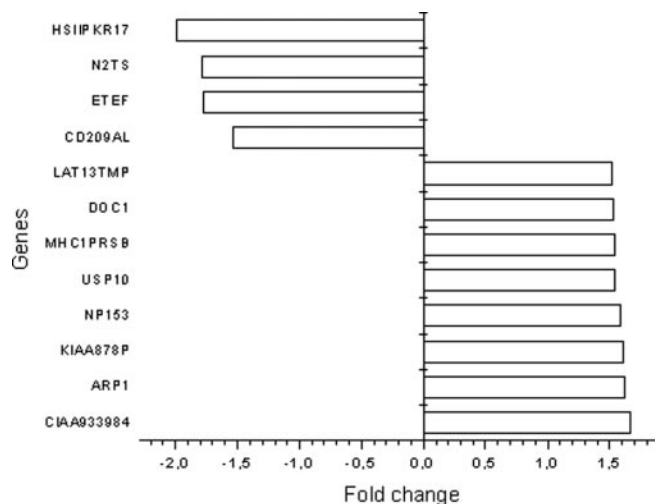


FIG. 6. Differences on the gene expression profile of human fibroblasts growing on ALT-C compared with fibroblasts growing on collagen type I. Human fibroblasts were seeded on dishes coated with ALT-C or collagen type I and incubated for 2 h. Fibroblasts were lysed, and total RNA was isolated. Labeled cRNA was synthesized and hybridized to Affymetrix HU-95A probe arrays for 16 h and scanned with the Affymetrix Gene Array Scanner. Genes up- or down-regulated at statistical significant levels ($p < 0.05$) and with a 1.5-fold change or greater compared with the control cells were considered. *PKIIDS*, protein kinase interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein-kinase gene; *N2TS*, neurofibromatosis 2 tumor suppressor; *ETEF*, eukaryotic translation elongation factor 1 α 1; *CD209AL*, CD 209 antigen-like; *LAT13TMP*, LAT1-3TM protein; *DOC1*, downregulated in ovarian cancer 1; *MHC1PRSB*, MHC class I polypeptide-related sequence B; *USP10*, ubiquitin-specific protease 10; *NP153*, nucleoporin 153kDa; *KIAA878P*, Rho-related BTB domain containing 3; *ARPI*, autism-related protein 1; *CIAA933984*, homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564B222 (from clone DKFZp564B222), mRNA sequence. A total of 8 genes were up-regulated and 4 genes were down-regulated in this experiment.

responsible for integrin activation. Recently, it has been demonstrated that two peptides derived from the Cys-rich domain of jararhagin and from a homologue, atrolysin a from *Crotalus atrox* snake venom, inhibit collagen I binding to platelets. This effect does not involve GPIV, another collagen receptor in platelets (40).

Our present data also show that ALT-C provides a suitable support for the adhesion of HUVECs. Moreover, in response to growing concentrations of ALT-C, either immobilized to plastic or incubated with HUVECs in the soluble form, it strongly induced endothelial cell proliferation. ALT-C up-regulates the expression of VEGF in human fibroblasts, which could explain the increase in HUVEC proliferation. We do not know if ALT-C could induce VEGF expression in HUVEC cells but it remains a possibility to be confirmed. Interestingly, ALT-C did not induce proliferation of mouse fibroblasts, thus suggesting a cell-specific effect.

The proliferative effect of ALT-C alone was similar to those exerted by VEGF and FGF-2, and the presence of ALT-C partially inhibited the endothelial cell proliferation induced by VEGF and FGF-2. Taken together, these data suggest that these proteins may partially act by a common cross-talk of signaling cascades (41).

ALT-C also up-regulates the expression of other growth factors involved in cell proliferation such as IL-11, TGF β , and EGR2 and 3, which are probably also involved on its positive effect on HUVEC proliferation. IL-11 induces proliferation of human T-cells (42), stimulates hematopoiesis and inhibits apoptosis in a variety of cells (43). EGR2 and 3 stimulate the activities of several transcription factors that are associated with cell proliferation such as c-Fos, SRF, and c-Myc (44).

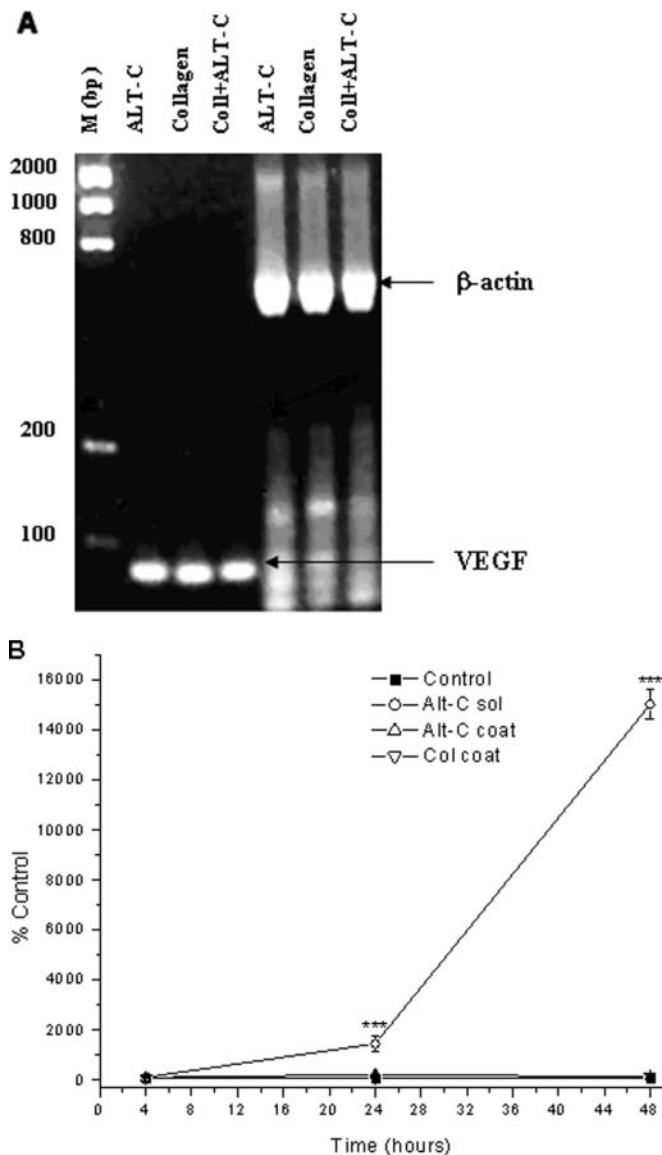


FIG. 7. ALT-C induces VEGF expression in human fibroblasts. Fibroblasts were grown on ALT-C (10 $\mu\text{g/ml}$), collagen type I (Collagen, 40 $\mu\text{g/ml}$) or collagen I treated with ALT-C (400 nM) (Coll + ALT-C). Cells were lysed 4, 24, or 48 h after treatment for total RNA and protein isolation. *A*, detection of VEGF mRNA. RNA samples (24 h) were treated with DNase before the experiments in order to discharge any contaminant DNA. RT-PCRs were run using the VEGF primers as described under "Experimental Procedures." β -Actin primers were used as endogenous control. *B*, detection of VEGF by immunoassay. ELISA assays for VEGF detection were performed using the kit Quantikine immunoassay for human VEGF as described under "Experimental Procedures." Error bars show the S.E. of two independent experiments in triplicate. The mean significantly different using Bonferroni's post-hoc is shown by ***, $p < 0.001$.

Interestingly, TGF β regulates several inhibitory cell-cycle proteins such as p27 and p15 (45). It seems that a delicate balance between the levels of different growth factors may exist, and the effect of factors that activate the cell cycle overwhelms the effect of factors with opposite actions.

Cell detachment usually results in anoikis, a form of apoptotic cell death that occurs upon loss of matrix attachment (46), except for transformed cells expressing activated Src and Ras oncogenes (47). As demonstrated for fibroblasts, ALT-C does not induce endothelial detachment from collagen, gelatin or fibronectin-coated surfaces (data not shown) and, apparently depending on cell type, it induces cell proliferation, therefore acting as a survival factor. It has been shown that integrins

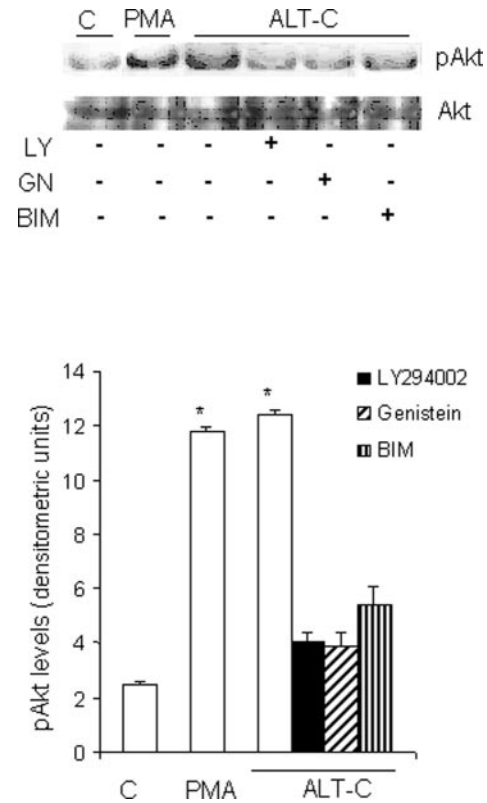


FIG. 8. ALT-C induces Akt/PKB phosphorylation in HUVECs. Cells were incubated with 5 nM ALT-C or PMA 15 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, with or without inhibitors genistein (80 μM), LY294002 (3 μM), or BIM (10 nM). Cell lysate was immunoprecipitated with anti-Akt/PKB antibodies and probed with anti-Akt/PKB and anti-phosphotyrosine antibodies by Western blotting. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni's t test, and $p < 0.05$ was taken as statistically significant.

and growth factor receptors coordinately regulate the expression of pro-apoptotic proteins to prevent anoikis (48). The small differences in the gene expression pattern of cell adhesion induced by immobilized ALT-C or collagen I are in agreement with the idea that this disintegrin-like protein could act as a collagen-mimetic (29). However, the effect of soluble ALT-C was very different from collagen, since it induced an important and prolonged increase in VEGF expression. These results suggest a role for ALT-C on HUVEC signaling by providing cells with sustained survival signals.

The serine/threonine protein kinase Akt/PKB has been described as a key regulator of cell viability (49, 50). Activation of Akt/PKB occurs through the direct binding, in the plasma membrane, of the phosphoinositide products of PI3K reaction to its pleckstrin homology domain (51). It has been demonstrated that matrix adhesion and Ras transformation both activate the PI3K \rightarrow Akt/PKB survival pathway (52) and that Akt/PKB is targeted for destruction by caspases during anoikis of endothelial cells (53). VEGF activation of Akt/PKB signaling in endothelial cells is also dependent on matrix attachment, and constitutively active Akt/PKB blocks the apoptosis induced by endothelial cell detachment (54).

On the other hand, many mitogens are activators of PKC family members, which have also been implicated as important mediators of endothelial cell viability (55). Phorbol esters, which mimic diacylglycerol and hence activate PKC isoenzymes, activate endothelial proliferation and induce the formation of tube-like structures by endothelial cells *in vitro* (38, 39).

Since ALT-C acted as a strong promoter of endothelial cell

adhesion and proliferation, we examined whether the interaction of ALT-C with HUVECs promotes the phosphorylation of Akt/PKB or involves the participation of PKC. Under the conditions of our assays, ALT-C promoted an important increase in Akt/PKB phosphorylation, which was blocked by the presence of PI3K and PKC inhibitors. Moreover, in the same assays, Akt/PKB phosphorylation was increased by PMA (a phorbol ester) to levels comparable to those resulting from ALT-C treatment of HUVECs. These data demonstrate that the binding of ALT-C to endothelial cells, or that the cell adhesion to this disintegrin-like molecule, initiates signaling cascades leading to the activation of PI3K → Akt/PKB survival pathway, and that PKC family members also participate in this response. In fact, it was shown that PMA activation of HUVECs also leads to the activation of PI3K (56).

The fact that genistein, a potent tyrosine-kinase inhibitor, also resulted in the blockade of ALT-C-induced Akt/PKB phosphorylation in endothelial cells is consistent with our previous observations (28). It has been demonstrated that disintegrins can induce intracellular signaling events such as an increase in the content of F-actin and cytoskeleton organization (57), protein tyrosine phosphorylation (58), and up- or down-regulation of ECM-related genes (29). In human neutrophils, ALT-C induces migration via integrin signaling, with activation of focal adhesion kinase (FAK) and its association with PI3K (28). In addition to PI3K, it is possible that ALT-C could be activating other upstream key proteins of the cross-talk signaling network common to integrins and tyrosine kinases receptors (growth and survival factors receptors) such as FAK and Ras, triggering the cell cycle (1, 5, 59). The activation of the ERK pathway promotes survival against a variety of apoptotic stimuli, and this pathway involves the expression of the caspase-8 inhibitor, c-Flip (60). ALT-C induces ERK-2 translocation to the nucleus (28), and this activity could result in a protective effect against apoptosis. Here we show for the first time that these events triggered by a disintegrin-like protein culminate in HUVEC proliferation.

Striking differences were observed when results were compared with BaG, a dimeric metalloprotease/disintegrin protein from *B. alternatus* venom (61). BaG (4 μ M) induced a significant detachment (64%) of fibronectin-bound K562 cells after 2h incubation (61). The proteolytic activity of BaG was completely inhibited by treatment with *o*-phenanthroline therefore a cleavage effect on cell surface proteins can be discharged. BaG is a ligand of $\alpha_5\beta_1$ integrin, therefore it inhibits cell binding to fibronectin. Also, saxatilin, an RGD-disintegrin from *Gloydus saxatilis* snake venom inhibited HUVEC proliferation (62). It was reported that α_v integrin antagonists with an RGD sequence induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells, disruption of actin cytoskeleton and cell detachment (8). The snake venom RGD-disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine endothelial cells (30). Accutin, an RGD-disintegrin also induces apoptosis in endothelial cells (15). These results show significant differences between ALT-C and the RGD-disintegrins, regarding the effects on cell adhesion and proliferation. Such opposite effects have not been demonstrated yet.

Members of the ADAMs protein family in mammals and other species have been demonstrated to bind to several integrins and also supporting cell adhesion through the disintegrin/cysteine-rich domains (35, 63). However, very little is known about intracellular signaling or gene expression mediated by the interaction of ADAMs and integrins. Given the homology of snake venom disintegrin-like proteins and the disintegrin domains of the members of the ADAMs protein family, these results suggest that similar functions could be

asserted to the last ones, such as signaling via integrins leading to key events as gene expression and affecting cell proliferation. Due to the positive effect on cell proliferation, we suggest that ALT-C could be called a *pro-integrin*. If induction of cell proliferation is a characteristic of all disintegrin-like proteins remains to be elucidated.

REFERENCES

- Hynes, R. O. (1992) *Cell* **69**, 11–25
- Hynes, R. O. (1987) *Cell* **48**, 549–554
- Lo, S. H., and Chen, L. B. (1994) *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 9–24
- LaFlamme, S. E., and Auer, K. L. (1996) *Semin. Cancer Biol.* **7**, 111–118
- Juliano, R. L., and Varner, J. A. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 812–818
- Mitjans, F., Sander, D., Adan, J., Sutter, A., Martinez, J. M., Jaggel, C. S., Moyano, J. M., Kreysch, H. G., Piulats, J., and Goodman, S. L. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 2825–2838
- Saiki, I., Murata, J., Lida, J., Nishi, N., Sugimura, K., and Azuma, I. (1988) *Br. J. Cancer* **59**, 194–197
- Castel, S., Pagan, R., Garcia, R., Casaroli-Marano, R. P., Reina, M., Mitjans, F., Piulats, J., and Vilaro, S. (2000) *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 502–512
- Gould, R. J., Polokoff, M. A., Friedman, P. A., Huang, T. F., Holt, J. C., Cook, J. J., and Niewiarowski, S. (1990) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **195**, 168–171
- Huang, T. F., Holt, J. C., Lukasiewicz, H., and Niewiarowski, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6157–6163
- Gan, Z. R., Gould, R. J., Jacobs, J. W., Friedman, P. A., and Polokoff, M. A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19827–19832
- Sheu, J. R., and Huang, T. F. (1994) *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 158–162
- Trikha, M., De Clerck, Y. A., and Markland, F. S. (1994) *Cancer Res.* **54**, 4993–4998
- Danen, E. H., Marcinkiewicz, C., Cornelissen, I. M., van Kraats, A. A., Pachter, J. A., Ruiter, D. J., Niewiarowski, S., and van Muijen, G. N. (1998) *Exp. Cell Res.* **238**, 188–196
- Yeh, C. H., Peng, H. C., and Huang, T. F. (1998) *Blood* **92**, 3268–3276
- Sheu, J. R., Yen, M. H., Kan, Y. C., Hung, W. C., Chang, P. T., and Luk, H. N. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1336**, 445–454
- Araki, S., Masuda, S., Maeda, H., Ying, M. J., and Hayashi, H. (2002) *Toxicol.* **40**, 535–542
- Brooks, P. C., Clark, R. A., and Cheresch, D. A. (1994) *Science* **264**, 569–571
- Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., and Cheresch, D. A. (1995) *Science* **270**, 1500–1502
- Paine, M. J., Desmond, H. P., Theakston, R. D., and Crampton, J. M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22869–22876
- Hite, L. A., Jia, L. G., Bjarnason, J. B., and Fox, J. W. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 182–191
- Jia, L. G., Wang, X. M., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., and Fox, J. W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13094–13102
- Souza, D. H., Iemma, M. R., Ferreira, L. L., Faria, J. P., Oliva, M. L., Zingali, R. B., Niewiarowski, S., and Selistre-de-Araujo, H. S. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **384**, 341–350
- Eble, J. A., Beermann, B., Hinz, H. J., and Schindt-Hederich, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 12274–12284
- Myles, D. G., Kimmel, L. H., Blobel, C. P., White, J. M., and Primakoff, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4195–4198
- Wolfsberg, T. G., Primakoff, P., Myles, D. G., and White, J. M. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 275–278
- Fox, J. W., and Long, C. (1998) in *Snake Venom Enzymes* (Bailey, G., ed) pp. 151–178, Alaken Press, Ft. Collins, CO
- Mariano-Oliveira, A., Coelho, A. L., Terruggi, C. H. B., Selistre-de-Araujo, H. S., Barja-Fidalgo, C., and Freitas, M. S. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 4799–4808
- Zigrino, P., Kamiguti, A. S., Eble, J., Drescher, C., Nischt, R., Fox, J. W., and Mauch, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 40528–40535
- Hong, S. Y., Lee, H., You, W. K., Chung, K. H., Kim, D. S., and Song, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 502–508
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. (1973) *J. Clin. Invest.* **52**, 2745–2756
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–252
- Yeh, C. H., Peng, H. C., Yih, J. B., and Huang, T. F. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 493–504
- Della Morte, R., Squillacioti, C., Garbi, C., Derkinderen, P., Belisario, M. A., Girault, J. A., Di Natale, P., Nitsch, L., and Staiano, N. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 5047–5054
- Zolkiewska, A. (1999) *Exp. Cell Res.* **252**, 423–431
- Shojima, I., and Walsh, K. (2002) *Circulation Res.* **90**, 1243–1250
- Frank, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., and Tschlis, P. N. (1995) *Cell* **81**, 727–736
- Montesano, R., and Orci, L. (1985) *Cell* **42**, 469–477
- Montesano, R., and Orci, L. (1987) *J. Cell. Physiol.* **130**, 284–291
- Kamiguti, A. S., Gallagher, P., Marcinkiewicz, C., Theakston, R. D., Zuzel, M., and Fox, J. W. (2003) *FEBS Lett.* **549**, 129–134
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., and Bussolino, F. (1999) *EMBO J.* **18**, 882–892
- Curti, A., Tafuri, A., Ricciardi, M. R., Tazzari, P., Petrucci, M. T., Fogli, M., Ratta, M., Lapalombella, R., Ferri, E., Tura, S., Bacarani, M., and Lemoli, R. M. (2002) *Haematol.* **87**, 373–380
- Leng, S. X., and Elias, J. A. (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 91059–91062
- Zeng, X. R., Sun, Y., Wenger, L., and Cheung, H. S. (2003) *Cells Tiss. Organs* **174**, 63–72
- Lloyd, R. V. (1997) *Endocr. Pathol.* **8**, 2121–2127
- Evan, G. I., and Vousden, K. H. *Nature* **411**, 342–348

47. Frisch, S. M., and Francis, H. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 619–626
48. Reginato, M., Mills, K. R., Paulus, J. K., Lynch, D. K., Sgroi, D. C., Debnath, J., Muthuswamy, S. K., and Brugge, J. S. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 733–740
49. Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R., and Greenberg, M. E. (1997) *Science* **275**, 661–665
50. Kennedy, S. G., Wagner, A. J., Conzen, S. D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P. N., and Hay, N. (1997) *Genes Dev.* **11**, 701–713
51. Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C., and Toker, A. (1997) *Science* **275**, 665–668
52. Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P. H., and Downward, J. (1997) *EMBO J.* **16**, 2783–2793
53. Bachelder, R. E., Wendt, M. A., Fujita, N., Tsuruo, T., and Mercurio, A. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34702–34707
54. Fujio, Y., and Walsh, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16349–16354
55. Cross, T. G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M., and Lord, J. M. (2000) *Exp. Cell Res.* **256**, 34–41
56. Ilan, N., Mahooti, S., and Madri, J. A. (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 3621–3631
57. Coelho, A. L., Freitas, M. S., Oliveira-Carvalho, A. L., Moura-Neto, V.; Zingali, R. B., and Barja-Fidalgo, C. (1999) *Exp. Cell Res.* **251**, 379–387
58. Belisario, M. A., Tafuri, S., Domenico, C., Della Morte, R., Squillaciotti, C., Lucisano, A., and Staiano, N. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1497**, 227–236
59. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) *Cell* **100**, 57–70
60. Aoudjit, F., and Vuori, K. (2001) *J. Cell Biol.* **152**, 633–643
61. Cominetti, M. R., Ribeiro, J. U., Fox, J. W., and Selistre-de-Araujo, H. S. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 171–179
62. Hong, S. Y., Koh, Y. S., Chung, K. H., and Kim, D. S. (2002) *Thromb Res.* **105**, 79–86
63. Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B. J., Loechel, F., and Wewer, U. M. (1999) *Am. J. Pathol.* **154**, 1489–1501